Travail du laboratoire de Physiologie de l'Institut Pasteur de Paris

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER N° 55

FACULTÉ DE MÉDECINE

SUR DEUX CONDITIONS DE MILIEU

Nécessaires à la saccharification de l'amidon

PAR LES AMYLASES SALIVAIRE ET PANCRÉATIQUE

LES CHLORURES ET LES PHOSPHATES

DANS LA SACCHARIFICATION

THÈSE

Présentée et publiquement soutenue à la Faculté de Médecine de Montpellier

Le 6 Mai 1911

PAR

Marcel LISBONNE

Né à Montpellier le 10 juin 1883

ANCIEN AIDE PRÉPARATEUR DE PHYSIOLOGIE

LAURÉAT DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE MONTPELLIER

(Prix Swieciki 1907)

LAURÉAT DE L'ACADÉMIE DES SCIENCES ET LETTRES DE MONTPELLIER

(Prix Jaumes 1910)

Pour obtenir le grade de docteur en Médecine

Examinateurs de la Thèse

MM. HEDON, professeur. — *Président.*

VILLE, professeur. — *Assesseurs.*

DERRIEN, agrégé. — *Assesseurs.*

FLEIG, ch. des fonctions d'agrégé. — *Assesseurs.*

MONTPELLIER

Imprimerie Grollier, Alfred DUPUY, successeur

7, Boulevard du Peyrou

SUR DEUX CONDITIONS DE MILIEU

Nécessaires à la Saccharification de l'Amidon

PAR LES AMYLASES SALIVAIRE ET PANCRÉATIQUE

LES CHLORURES ET LES PHOSPHATES DANS LA SACCHARIFICATION

Travail du laboratoire de Physiologie de l'Institut Pasteur de Paris

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER N° 55

FACULTÉ DE MÉDECINE

SUR DEUX CONDITIONS DE MILIEU

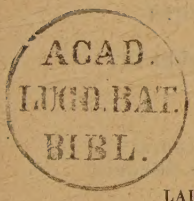
Nécessaires à la saccharification de l'amidon PAR LES AMYLASES SALIVAIRE ET PANCRÉATIQUE

LES CHLORURES ET LES PHOSPHATES DANS LA SACCHARIFICATION

THÈSE

Présentée et publiquement soutenue à la Faculté de Médecine de Montpellier

Le 6 Mai 1911



PAR

Marcel LISBONNE

Né à Montpellier le 10 juin 1883

ANCIEN AIDE PRÉPARATEUR DE PHYSIOLOGIE

LAURÉAT DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE MONTPELLIER

(Prix Swiecicki 1907)

LAURÉAT DE L'ACADÉMIE DES SCIENCES ET LETTRES DE MONTPELLIER

(Prix Jaumes 1910)

Pour obtenir le grade de docteur en Médecine

Examinateurs de la Thèse	MM. HEDON, professeur.	*Président.*
	VILLE, professeur.	*Assesseurs.*
	DERRIEN, agrégé.	
	FLEIG, ch. des fonctions d'agrégé.	

MONTPELLIER

Imprimerie Grollier, Alfred DUPUY, successeur

7, Boulevard du Peyrou

PERSONNEL DE LA FACULTÉ

Administration

MM. MAIRET (✻) ..... DOYEN.
SARDA ..... ASSESSEUR.
IZARD ..... SECRÉTAIRE.

Professeurs

Clinique médicale	MM. GRASSET (✻). Chargé de l'enseign[t] de pathol. et thérap. génér.
Clinique chirurgicale	TEDENAT (✻).
Thérapeutique et matière médicale	HAMELIN (✻).
Clinique médicale	CARRIEU.
Clinique des maladies mentales et nerveuses	MAIRET (✻).
Physique médicale	IMBERT.
Botanique et histoire naturelle médicales	GRANEL.
Clinique chirurgicale	FORGUE (✻).
Clinique ophtalmologique	TRUC (✻).
Chimie médicale	VILLE.
Physiologie	HEDON.
Histologie	VIALLETON.
Pathologie interne	DUCAMP.
Anatomie	GILIS (✻).
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	ESTOR.
Microbiologie	RODET.
Médecine légale et toxicologie	SARDA.
Clinique des maladies des enfants	BAUMEL.
Anatomie pathologique	BOSC.
Hygiène	BERTIN-SANS (H.)
Pathologie et thérapeutique générales	RAUZIER. Chargé de l'enseign[t] de la clinique médicale.
Clinique obstétricale	VALLOIS.

Professeurs-adjoints : MM. De ROUVILLE, PUECH, MOURET
Doyen honoraire : M. VIALLETON.
Professeurs honoraires : MM. E. BERTIN-SANS (✻), GRYNFELTT.
M. H. GOT, *Secrétaire honoraire*

Chargés de Cours complémentaires

Clin. ann. des mal. syphil. et cut	MM. VEDEL, agrégé (ch. de cours)
Clin. ann. des mal. des vieillards	VIRES, agrégé libre. (ch. de cours)
Pathologie externe	LAPEYRE, agrégé libre.
Clinique gynécologique	De ROUVILLE, professeur-adjoint.
Accouchements	PUECH, professeur adjoint.
Clin. des mal. des voies urinaires	JEANBRAU, agrégé libre (ch. de cours)
Clinique d'oto-rhino-laryngologie	MOURET, professeur adjoint.
Médecine opératoire	SOUBEYRAN, agrégé.

Agrégés en exercice

MM. GALAVIELLE.	MM. LEENHARDT.	MM. DELMAS (Paul).
VEDEL.	GAUSSEL.	MASSABUAU.
SOUBEYRAN.	RICHE.	EUZIÈRE.
GRYNFELTT Ed.	CABANNES.	LECERCLE.
LAGRIFFOUL.	DERRIEN.	FLEIG (ch. des fonct. d'agrégé).

Examinateurs de la thèse :

MM. HEDON, *professeur président.* | MM. DERRIEN, *agrégé.*
VILLE, *professeur.* | FLEIG (ch. des fonct. d'agrégé).

La Faculté de Médecine de Montpellier déclare que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leur auteur ; qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A MES MAITRES

M. LE PROFESSEUR HÉDON

Que je ne pourrai assez remercier des marques d'intérêt et d'estime qu'il n'a cessé de me témoigner pendant les cinq années que j'ai passées dans son laboratoire.

M. LE DOCTEUR DELEZENNE

PROFESSEUR A L'INSTITUT PASTEUR

CHEF DU SERVICE DE PHYSIOLOGIE

En témoignage de ma profonde gratitude et de mon inaltérable reconnaissance.

M. LISBONNE

DU MÊME AUTEUR

1. Recherches sur un séro-diagnostic du kyste hydatique par la méthode des précipitines. C. R. Soc. Biol., LXII, 1907, p. 1198. En collaboration avec C. Fleig.

2. Nouvelles recherches sur le séro-diagnostic du kyste hydatique. C. R Soc. Biol., LXV, 1908, p. 512. En collaboration avec C. Fleig.

3. Quelques données pratiques sur le précipito-diagnostic du kyste hydatique. *Presse Médicale*, 1909, n° 93, 20 novembre. En collaboration avec C. Fleig.

4. Echinococcose et précipitines. Le précipito-diagnostic du kyste hydatique. Mémoire couronné par la Faculté de Médecine de Montpellier. Prix Swiecicki, 1909. En collaboration avec C. Fleig. (A paraître.)

5. Action vaso-motrice comparée des aldhéydes sur le rein. C. R. Soc. Biol., LXV, 1908, p. 558. En collaboration avec C. Fleig.

6. Action des courants alternatifs industriels de haute tension sur l'organisme. C. R. Soc. Méd. de Montpellier, 1908 et C. R. Soc. Biol. LXVI, 1909, p. 189.

7. Contribution à l'étude des courants alternatifs industriels de haute tension sur l'organisme. *Arch. d'électricité médicale expérimentales et cliniques*, XVII, 1910, p. 125. Ces deux dernières publications en collaboration avec Hédon, Gagnière et Berthon.

8. Le sucre existe-t-il dans la salive du chat? C. R. Soc. Biol., XLVI, 1909, p. 835. En collaboration avec Mestrezat.

9. Sur la nature des hémolysines formées par injection d'huile d'œuf chez le lapin. C. R. Soc. Biol., LXX, 1911, p. 26. En collaboration avec A. Frouin.

10. Sur l'invertine de la salive. C. R. Soc. Biol., LXVIII, 1910. p. 983.

11. Sur une condition de milieu nécessaire à l'action de l'amylase salivaire. C. R. Soc. Biol., LXX, 1911, p. 62.

12. Sur le rôle des électrolytes dans la saccharification de l'amidon par les amylases salivaires et pancréatiques. C. R. Soc. Biol., LXX, 1911, p. 132.

13. Influence des chlorures et des phosphates sur la saccharification de l'amidon déminéralisé par les amylases salivaire et pancréatique. C. R. Soc. Biol., LXX, 1911, p. 207.

14. Les sécrétions toxiques des agents parasitaires. Les réactions de défense de l'organisme aux parasites animaux en particulier dans l'échinococcose. Applications aux séro-diagnostics. Mémoire couronné par l'Académie des Sciences et Lettres de Montpellier, 1910 Prix Jaumes. (A paraître).

INTRODUCTION

La nécessité, dans les processus diastasiques en général, de la collaboration de substances simples, chimiquement définies, n'est plus à démontrer aujourd'hui. Admise de tous sans conteste, cette notion, solidement établie par les recherches de ces quinze dernières années, doit être considérée comme une des acquisitions les plus précieuses faites par la chimie des fermentations depuis la découverte même des diastases (1833). Elle est aussi une des plus aptes à faire progresser nos connaissances sur les phénomènes diastasiques dont la nature et l'essence sont presque aussi inconnues et aussi mystérieuses qu'au temps de Payen et Persoz.

Les premières recherches, méthodiquement conduites dans cet ordre d'idées, ont immédiatement démontré le rôle spécifique joué par certains éléments minéraux dans les actions diastasiques. Green (1) en 1887 et Freund (2) en 1888 entrevirent tous deux l'influence des sels de chaux sur la coagulation du sang, mais c'est à Arthus et Pagès (1890) (3) et surtout à Pekelharing (4) que revient le mérite d'avoir mis pour la première fois en lumière la nécessité absolue de la présence d'une substance minérale (sels de chaux) au cours d'un phénomène enzymatique (coagulation du sang) et d'en avoir déterminé le mécanisme d'action. A quelque temps d'intervalle, Arthus et Pagès (5) d'une part, Hammarsten (6)

de l'autre, établissent que ces mêmes sels de chaux sont indispensables à la coagulation du lait par le lab-ferment.

En 1895, G. Bertrand et Mallèvre (7) arrivent à des résultats en tous points analogues, en démontrant la nécessité des sels de chaux pour la coagulation de la pectine par la pectase de la carotte [1].

En 1883, Hirokoruko Yoshima (9) découvre la laccase et G. Bertrand (10), reprenant la question, met en lumière, en même temps que le chimiste japonais, le rôle prépondérant que peut jouer un métal, le manganèse, dans le fonctionnement des oxydases [2].

Dans le même ordre d'idées, Spitzer (11) établit que l'activité péroxydiastasique des extraits d'organes est fonction jusqu'à un certain point de leur teneur en fer, et tout récemment Sarthou (14) a pu constater que ce même métal joue dans la schinoxydase du poivrier le même rôle que celui assigné au manganèse dans la laccase par G. Bertrand.

En 1905, Delezenne (15) apporte des faits du plus haut intérêt en ce qui concerne l'influence des métaux sur les actions diastasiques. Il montre que le suc pancréatique, rigoureusement inactif sur l'ovalbumine lorsqu'il est recueilli dans certaines conditions d'asepsie et de pureté (16),

[1] Les sels de chaux activent considérablement et électivement la coagulation de l'amidon soluble par l'amylo-coagulase du malt découverte par Fernbach et Wolff (8). On voit par là l'influence générale du calcium sur les phénomènes de coagulation diastasique.

[2] Pour Dony-Hénault (12), le manganèse seul est l'agent de la transformation du laccol, le reste du soi-disant ferment n'étant qu'impuretés. Par contre, et tout récemment, Bach (13) est arrivé à déminéraliser complètement la laccase sans lui faire perdre, malgré cette démanganisation (si l'on peut s'exprimer ainsi), son pouvoir diastasique. La question est donc en suspens.

acquiert une activité protéolytique considérable par la simple adjonction des sels de chaux. Cette activation a les allures d'un phénomène brusque qui n'éclate qu'après un temps perdu de deux à trois heures et ne peut être suscitée que par les seuls sels de chaux [1]. Par ces expériences était démontrée avec une précision remarquable l'action d'un métal sur l'activité d'une diastase.

En 1905, à la suite des mémorables recherches de Buchner, qui ont abouti à la découverte de la zymase alcoolique, Harden et Young (17-18) observent que le suc obtenu par le broyage de la levure renferme deux substances essentielles pour la fermentation et le démontrent élégamment par la dialyse du suc de levure. Dans ces conditions, ils constatent qu'il passe *quelque chose* à travers la membrane, tandis qu'il y reste un résidu inactif, incapable de faire fermenter le sucre. Le liquide de dialyse est également inactif; mais en réunissant les deux portions inactives, on reconstitue un liquide qui dédouble à nouveau la saccharose. Le filtrat conserve sa propriété, même après ébullition. Après de patientes recherches sur sa constitution chimique, Harden et Young ont finalement établi que l'action de ce filtrat était due à la présence de phosphates alcalins. Sans rien pouvoir encore préjuger de certain sur le rôle que peut jouer le phosphore dans un tel phénomène, il n'en reste pas moins définitivement acquis que la fermentation produite par la zymase est une réaction qui nécessite la présence de phosphates, notion qu'Harden a hardiment résumée sous cette forme : « Pas de fermentation alcoolique sans phosphore. »

L'étude de certaines lipases a permis à Magnus (19) d'ar-

[1] A l'exception cependant des sels de strontium et de baryum, doués eux aussi, dans certaines conditions, de propriétés légèrement activantes.

river à des résultats analogues et presqu'aussi démonstratifs. Précipitant la lipase hépatique d'une macération de foie par le phosphate et le carbonate d'urane, il obtient un précipité qu'il épuise par l'eau salée. Cette eau a acquis le pouvoir de dédoubler les graisses et de saponifier les éthers, même relativement stables. Soumise à la dialyse, cette solution diastasique perd toute action lipasique. L'adjonction de NaCl est inefficace ; par contre, en ajoutant soit de l'extrait hépatique chauffé, inactif par lui-même, soit le liquide de dialyse, on lui restitue sa propriété diastasique. La dialyse a donc fait perdre à cette lipase une substance co-fermentaire sans laquelle elle est dénuée de toute action. Contrairement à l'exemple précédent, nous ignorons dans ce cas la nature chimique de la substance qui a dialysé (sels biliaires ?).

Si nous passons dans le domaine des diastases amylolytiques, nous allons trouver des faits analogues aux précédents, qui semblent être autant d'exemples, jusqu'à un certain point, apportés à la théorie des substances co-fermentaires.

Parmi ceux-là, les uns, qui présentent une rigueur absolue, établissent la *nécessité de la présence de substances minérales pour l'amylolyse ;* les autres ne montrent que le *rôle favorisant* joué par ces mêmes substances minérales.

Je les analyserai en détail ; leur complète connaissance est nécessaire à la compréhension de la suite de ce travail ; de plus, j'estime que mes recherches en constituent la suite logique et nécessaire.

A la suite de Nasse (20), Kubel (21), Grutzner (22), dont les travaux avaient établi depuis longtemps l'action activante qu'exerce sur la ptyaline les sels halogènes de sodium, et notamment le NaCl, Sydney Cole (23) reprend la question dans des conditions d'expérimentation meilleures et plus précises que ses devanciers, à l'aide de salive dialysée et d'amidon purifié par la même méthode. Il voit que, dans ces

conditions, la ptyaline est encore active sur l'amidon, quoique son pouvoir diastasique ait bien diminué et que l'adjonction de certains sels renforce considérablement son activité. Il constate que l'action de ces sels sur la ptyaline dépend avant tout de la concentration où ils sont employés; mais il établit surtout que ce sont les *sels d'acides monobasiques* et parmi eux les sels d'acides forts qui activent le plus la diastase, alors que les sels d'acides bibasiques (sulfates) ou tribasiques (phosphates) ralentissent son action. La liste des sels rangés suivant leur pouvoir activant décroissant est précisément la liste des acides rangés suivant leur force décroissante :

Sels	Acides
NaCl	HCl
$MgCl^2$	HCl
Kbr	HBr
KI	HI
AzO^3K	AzO^3H
H-COONa	H-COOH
CH^3COONa	CH^3COOH

Dans le même travail, Cole étudie l'action des divers acides sur le pouvoir diastasique. Je reviendrai sur ce point ultérieurement. L'ensemble de ces faits, l'auteur les explique par la dissociation électrolytique des sels en solution, les ions hydroxyles auraient une action ralentissante sur l'activité de l'enzyme, tandis que les ions — exerceraient une action précisément inverse. Parmi les ions —, les radicaux d'acides forts possèdent un pouvoir activant plus grand que les radicaux d'acides faibles. Enfin les ions + et — exercent le maximum de leurs effets à des concentrations différentes, de sorte que suivant leur concentration dans un liquide diastasique, ce seront tantôt les ions + et tantôt les ions — qui l'emporteront.

En 1906, Bierry, Henri et Giaja (24-25-26) arrivent à des résultats d'un très grand intérêt. Soumettant le suc pancréatique à la dialyse contre l'eau distillée, ils constatent que la diastase (qui ne donne plus le biuret et ne trouble plus par AzO^3Ag) est devenue rigoureusement inactive sur l'empois d'amidon, même après plusieurs jours de contact, à condition que l'expérience se poursuive aseptiquement[1]. L'adjonction de certains électrolytes à la diastase, spécialement de chlorures (et parmi ceux-ci, très électivement, le NaCl) lui fait récupérer son pouvoir amylolytique, de sorte qu'au bout de deux heures, par exemple, il est aisé de mettre en évidence des quantités de maltose largement appréciables par la liqueur de Fehling.

Les chlorures de K, Am, Ca, Ba, Sr, Mn, sont doués de la même propriété. Les bromures, iodures des mêmes métaux sont déjà moins activants. Quant aux sulfates, carbonates, oxalates, phosphates de K, Na, Ca, ils sont dénués d'activité ; mais « ils deviennent actifs après adjonction de NaCl ».

Ces expérimentateurs n'ont malheureusement pas donné un seul chiffre qui permette de juger du degré de réactivation de la diastase ou de l'action que jouent les électrolytes non actifs par eux-mêmes, mais qui le deviennent après adjonction de NaCl.

Ainsi ce travail attirait l'attention sur la nécessité de la présence de certains ions, l'ion Cl en particulier, pour le fonctionnement des amylases. Comme on le voit, ce n'est plus ici un métal dont la présence est indispensable au fonc-

[1] Il est juste de signaler que Ford et Guthrie (27), en 1903, attiraient l'attention sur ce fait qu'une amylase purifiée ne saurait produire une hydrolyse normale de l'amidon déminéralisé. Qu'entendaient-ils par là ? Leur mémoire ne permet pas de s'en rendre compte.

tionnement de la diastase, comme dans la plupart des exemples cités plus haut, mais le radical acide du sel.

Presqu'en même temps que ces recherches, paraissaient celles de Preti (28), calquées sur le même modèle. Expérimentant avec les amylases de la pancréatine commerciale, de l'urine, du sérum, du malt et avec la taka-diastase, il constate que la dialyse rend les trois premières inactives sur l'empois d'amidon et n'a aucun effet sur les autres [1]. L'adjonction de NaCl restitue à la diastase une très considérable partie de son activité, de sorte qu'elle peut recouvrer un pouvoir presque égal à celui qu'elle avait avant la dialyse.

Ces faits corroborent et précisent ceux de Bierry, Henri et Giajà ; pour notre part, nous n'avons jamais pu reproduire des réactivations aussi considérables.

Enfin Guyénot (29) a étudié à son tour l'influence de la dialyse sur le pouvoir amylolytique de la salive. Il trouve qu'après traitement, la salive est devenue 113 fois moins active qu'avant. Réajoutant alors divers électrolytes en vue d'activer la diastase ainsi affaiblie, il constate que « la chaux est une des bases les plus utiles au ferment salivaire », ainsi que la potasse, alors que le sodium et le magnésium lui paraissent faiblement utiles. La chaux agit aussi bien sous forme de chlorure que de phosphate, mais devient nuisible à l'état de carbonate et de sulfate. Enfin le sodium et le potassium, utiles à l'état de chlorures, sont inhibiteurs sous forme de carbonates et de bicarbonates [2].

[1] Bierry, Henri et Giaja ne sont pas parvenus d'avantage à inactiver l'extrait de malt par la dialyse.

[2] Guyénot signale qu'il a obtenu des résultats analogues avec la salive sous-maxillaire du chien recueillie par excitation de la corde du tympan ou par injection de pilocarpine. La réussite de telles expériences ne s'explique que très difficilement pour qui songe à l'inactivité quasi absolue de cette salive chez le chien.

En résumé, les résultats de ces expérimentateurs, quoique différents par des points de détail, concourent tous à établir l'importance du rôle joué par certains sels dans les phénomènes de la saccharification diastasique ; mais ceux-là seuls sont à retenir pour le moment qui démontrent qu'en l'absence de chlorures, les amylases ne sauraient exercer la moindre action hydrolysante.

Pareille interprétation n'a point été admise par Slosse et Limbosch (30) qui ont récemment étudié la question. Pour eux, il ne faut pas rapporter la diminution du pouvoir digestif de l'amylase salivaire dialysée au départ des sels, mais bien plutôt à un véritable phénomène d'adsorption par le dialyseur (sac de collodion) qui soustrait au liquide diastasique la plus grande partie de sa substance active. A l'appui de cette conception, Slosse et Limbosch ont institué des recherches qui mettent clairement en lumière la grande facilité avec laquelle les parois de collodion adsorbent les ferments digestifs (amylase, lipase, pepsine, trypsine) non seulement par entraînement mécanique, mais encore par simple contact prolongé pendant quelques heures.

Pour si intéressantes que soient ces expériences, par suite de techniques essentiellement différentes, leur interprétation, indiscutable pour le cas qu'ont envisagé Slosse et Limbosch, ne saurait également s'appliquer aux résultats signalés antérieurement ; elles ne peuvent surtout pas expliquer pourquoi une diastase, inactivée par la dialyse, récupère son action par adjonction d'un sel.

De leur côté, Bierry et Frouin (31) ont vu que le sac intestinal dialysé est incapable d'intervertir le sucre et que, par adjonction de chlorures, on lui rend son activité diastasique.

Au cours de recherches sur l'invertine salivaire (32), ayant eu l'occasion de dialyser soigneusement de la salive

humaine, filtrée au préalable sur bougie, j'ai voulu me rendre compte des modifications qu'apportait à la ptyaline la soustraction des sels qui se trouvent normalement dans la salive ($NaCl$, KCl, CO^3Na^2, CO^3NaH, Po^4HK^2 CAzSK). Voulant surtout expérimenter en l'absence de tout sel, il fallait éviter une cause d'erreur à l'abri de laquelle ne se sont pas mis les divers auteurs dont j'ai rapporté les travaux ; il fallait n'opérer qu'avec un amidon purifié, privé des sels qu'il contient toujours en quantité assez considérable. Il est à remarquer que dans toutes les recherches que j'ai mentionnées, on s'est préoccupé de débarrasser la diastase des sels qui l'accompagnent, mais jamais de faire subir le même traitement à la substance amylacée. Cole Sydney, Guyénot, Slosse et Limbosch, il est vrai, ont pris le soin de laver l'amidon à l'eau distillée ou de le dialyser, avant de le mettre en empois ; mais cette opération parfaitement inefficace ne peut servir à purifier l'amidon que d'infime manière, lorsqu'on songe que des solvants aussi puissants que l'acide chlorydrique ne permettent pas encore d'arriver au résultat recherché.

On sait que l'amidon ordinaire de pommes de terre, par exemple, laisse après incinération un résidu de cendres de plus de 3 grammes par kilogramme. L'analyse chimique y a décelé de la chaux, de la potasse, du manganèse, de la silice et surtout du phosphore en très grande quantité, fait qui permet de supposer que la plus grande partie de ces bases se trouve combinée au phosphore sous forme soit de phosphates, soit de phosphates organiques de constitution encore mal connue.

Il paraît donc nécessaire, si l'on veut étudier d'une façon rigoureuse l'action des divers sels sur les amylases, de commencer par établir comment se comporte une dyastase amylolytique exempte de matières minérales vis-à-vis d'un amidon qui lui-même en est débarrassé. Il est alors facile,

en ajoutant au milieu le sel dont on veut rechercher l'action, de savoir s'il exerce ou non une influence sur le processus de la saccharification. C'est ainsi qu'on pourra étudier l'action des sels qui, d'une part entrent dans la constitution du liquide diastasique — salive, suc pancréatique — et de ceux qui, d'autre part, font en quelque sorte partie intégrante du grain d'amidon. Les chlorures, les carbonates, bicarbonates sont les éléments les plus importants de la première catégorie, en même temps que ceux dont l'influence a été le mieux étudiée dans les expériences relatées plus haut, toutes réalisées à l'aide d'amylases d'origine animale. La seconde catégorie de ces sels est entièrement constituée par les phosphates, dont l'influence sur la saccharification a été mise en lumière par les expérimentateurs qui ont étudié la saccharification de l'amidon par les diastases d'origine végétale et, plus spécialement, par l'amylase de l'extrait de malt — qui comme on le sait, renferme une certaine proportion de phosphates.

C'est à M. Fernbach que l'on doit les travaux les plus intéressants sur ce sujet auquel il a consacré depuis vingt ans de multiples recherches, soit seul, soit avec la collaboration de M. Wolff.

Opérant avec l'extrait de malt, il a établi que les phosphates agissent dans la saccharification de l'amidon par la réaction qu'ils communiquent au milieu dans lequel se produit la réaction diastasique ; mais il a surtout montré que *les phosphates primaires étaient des agents activants de la diastase, tandis que les phosphates neutres ou secondaires exerçaient une action nettement inhibitrice* (33).

Les expériences de Kjeldahl (34), confirmées par divers auteurs, avaient établi que de petites quantités d'acide exerçaient une influence favorisante considérable sur la saccharification de l'amidon par l'extrait de malt. Fernbach,

reprenant la question, constate que le fait est exact, mais que la déduction qu'on a voulu en tirer, à savoir « que l'activité de l'amylase est favorisée par la présence de petites quantités d'acide » est fausse en son sens absolu, « parce qu'on n'a pas songé jusque-là à se demander si cet acide reste libre ou s'il est employé à décomposer des sels présents ». Or l'expérience démontre que cette dernière hypothèse est vraie. Les petites quantités d'acides ne sont activantes que parce qu'elles trouvent, soit dans l'extrait de malt, soit dans l'amidon, *des phosphates neutres* — inhibants — qu'*elles transforment en phosphates acides*, doués, eux, de propriétés activantes. Fernbach montre que cette transformation peut être facilement suivie au moyen d'un indicateur coloré extrêmement précieux dans ce cas, l'hélianthine ou méthylorange, qui, de la teinte jaune que lui conféraient les phosphates neutres — alcalins à cet indicateur — passe à la teinte neutre, caractéristique des phosphates acides. A ce moment si l'on ajoute encore des traces d'acide, celui-ci ne pouvant plus se combiner, demeure à l'état libre (comme l'indique le virage au rouge de l'orangé) et exerce une action nettement inhibitrice sur la réaction diastasique.

De l'ensemble de ces faits et de bien d'autres qui ne trouvent point place ici, Fernbach a tiré les conclusions suivantes :

1° Les acides libres sont nettement défavorables à l'action de l'amylase du malt ;

2° Les phosphates neutres gênent l'action de l'amylase et les phosphates acides au contraire la favorisent ;

3° *En somme tout le mécanisme de l'influence des acides sur la saccharification de l'amidon par l'extrait de malt se résume en une transformation de phosphates.*

Cette même action favorisante jouée par de petites quan-

tités d'acides s'exerce aussi sur les amylases d'origine animales, salivaire ou pancréatique, ainsi qu'il ressort des travaux de Chittenden et Griswold (35), Langley (36), Langley et Eves (37), Kubel (21), Vernon (38), Sydney Cole (23) ; mais aucun de ces auteurs n'a songé à rechercher si l'acide ajouté restait à l'état libre ou servait à transformer des sels présents, fait qui, on le voit maintenant, présente une importance capitale.

L'influence des phosphates dans la saccharification diastasique de l'amidon est donc considérable, à ne s'en tenir qu'à ces recherches. Roger (39), allant encore plus loin, a voulu leur faire jouer un rôle primordial, analogue à celui qu'il joue, d'après Harden, dans la fermentation alcoolique. Etudiant l'action de ces sels sur l'amylase salivaire, il a soutenu, non seulement qu'ils jouaient ici un rôle favorisant, mais encore que *leur présence était une condition nécessaire au fonctionnement de la diastase*. On verra dans la suite que je ne suis pas arrivé à confirmer cette notion.

L'exposé, pourtant succinct, de cette série de faits justifie amplement l'intérêt sans cesse grandissant qui s'attache à l'étude du rôle joué dans les réactions diastasiques en général par les substances minérales qui accompagnent aussi bien la diastase que la substance à transformer. Il montre les précautions minutieuses qu'il faudra apporter à la purification des agents qui entrent en jeu dans une action enzymatique lorsqu'on voudra expérimenter en l'absence de tout corps susceptible d'imprimer une modification au phénomène.

En particulier, pour ce qui concerne les actions amylolytiques auxquelles sont consacrées ce travail, je me suis attaché, non seulement à purifier les liquides diastasifères, *mais encore et surtout* les substances amylacées sur lesquelles ils agissent.

Grâce à cette idée directrice, réalisée par certains artifices de technique, j'ai pu observer, dans ce domaine de biochimie pourtant si exploré, quelques points qui n'avaient pas encore été signalés.

Ils nous ont paru dignes d'être étudiés en détail parce qu'ils attirent l'attention, non seulement sur la diversité des amylases suivant leur origine végétale ou animale, mais encore et *surtout* sur la *diversité des amidons* utilisés dans les recherches de saccharification, diversité dont l'influence sur la marche des phénomènes diastasiques est primordiale.

Ce travail est divisé en trois parties :

La première est consacrée à l'étude d'une condition de réaction de milieu nécessaire au fonctionnement des amylases salivaire et pancréatique.

Dans la seconde partie, j'étudie l'influence sur la saccharification des chlorures dont la présence est indispensable à l'activité diastasique.

La troisième partie est consacrée aux recherches relatives à l'influence des chlorures et des phosphates sur la saccharification diastasique de l'*amidon déminéralisé*.

TECHNIQUE GÉNÉRALE

J'ai étudié comparativement l'action de trois diastases amylolytiques dialysées (l'amylase salivaire, l'amylase pancréatique et l'amylase du malt) sur trois variétés de subtance amylacée (l'amidon de pomme de terre ordinaire, l'amidon purifié suivant la méthode de MM. Fernbach et Wolff, et l'amidon déminéralisé de M. Malfitano et de M^lle^ Moschkoff).

I. La salive qui a servi à ces expériences était de la salive humaine mixte, filtrée sur bougie Berkefeld, après dilution dans un égal volume d'eau distillée.

II. Le suc pancréatique était obtenu par injection de sécrétine chez le chien immobilisé par la morphine. Il était recueilli aseptiquement après qu'on en avait laissé perdre les premiers centimètres cubes sécrétés.

III. L'extrait diastasique de malt a été préparé en faisant macérer 10 grammes de malt vert broyé dans 100 cc. d'eau distillée pendant 4 à 5 heures. La macération obtenue était filtrée sur papier et ensuite stérilisée par filtration sur bougie Berkefeld.

Les dialyses ont toutes été effectuées à l'aide de sacs de

collodion stériles, suivant la technique en usage dans le laboratoire de physiologie de l'Institut Pasteur [1].

Dans la plupart des cas, les dialyses étaient faites contre l'eau distillée, telle qu'elle est fournie dans les laboratoires de l'Institut ($K = 1{,}28 \times 10^{-5}$ environ). Dans certaines expériences, on a substitué à cette eau de l'eau redistillée dans un alambic d'argent ($K = 6{,}54 \times 10^{-6}$ environ), procédé qui permet de pousser la dialyse à un degré plus élevé.

Enfin, dans quelques cas, on a dialysé les diastases contre de l'eau salée (NaCl à 9 °/$_{oo}$).

Les eaux de dialyse étaient renouvelées bi-qotidiennement pendant les quatre premiers jours, et quotidiennement à partir de ce moment.

Les temps de dialyse ont été très variables ; *jamais inférieurs à huit jours*, ils ont pu dans certaines expériences s'élever à 20 et 30 jours.

La technique suivie pour la préparation des amidons sera indiquée ultérieurement (première partie et troisième partie) au moment de rapporter les expériences pratiquées avec leur aide.

Organisation des expériences. — Toutes les expériences ont été effectuées de la manière suivante : Dans des tubes à essai, soigneusement lavés à l'eau distillée, on versait d'abord les liquides diastasiques, on ajoutait ensuite les divers électrolytes à étudier, et en dernier lieu l'empois d'amidon.

Les saccharifications ont été faites à 40° et 50° pendant des temps de 3 ou 4 heures, sans prendre de précautions

[1] Formule du collodion employé : Coton azotique, 25 gr. Alcool absolu, 600 cc. Ether à 65°, 400 cc.

contre l'ingérence des microbes dont le développement restreint en ce laps de temps ne troublait en rien les résultats, comme nous l'avons constaté.

Les dosages de sucre ont été faits avec la liqueur de Fehling ferrocyanurée, méthode suffisamment précise pour l'objet de ces études. Les quantités de sucre sont évaluées en glycose.

PREMIÈRE PARTIE

SUR UNE CONDITION DE RÉACTION DE MILIEU NÉCESSAIRE AU FONCTIONNEMENT DES AMYLASES SALIVAIRE ET PANCRÉATIQUE

ACTION DES AMYLASES SALIVAIRE ET PANCRÉATIQUE SUR L'AMIDON PURIFIÉ DE FERNBACH ET WOLFF

Activité amylolytique de la salive dialysée.

Si l'on met en présence d'empois d'amidon de la salive purifiée par dialyse contre *l'eau distillée ordinaire*, on constate que la diastase liquéfie très rapidement la substance amylacée, et que, dès les premières minutes, il s'est formé des quantités de sucre réducteur faciles à mettre en évidence par la liqueur de FEHLING.

Par conséquent, la dialyse faite dans ces conditions ne suffit pas à inactiver la ptyaline, contrairement à ce qu'avaient vu BIERRY, HENRI et GIAJA pour l'amylase pancréatique. Cependant, il est de toute évidence que la diastase

a perdu une très considérable partie de son activité. Tour à tour Sydney Cole, Guyénot, Slosse et Limbosch étaient arrivés à ce même résultat que j'observais dès le début de mes recherches ; ces derniers pensaient même trouver dans ce fait un argument de nature à étayer leur explication de l'adsorption des ferments par les parois de collodion.

En présence d'un tel résultat, j'ai pensé que si l'on purifiait à son tour la substance amylacée en la privant des substances minérales qu'elle contient, on obtiendrait sans doute un amidon qui ne serait plus saccharifiable par la ptyaline dialysée, par suite de la pénurie du milieu en électrolytes.

Préparation de l'amidon purifié.

Restait à choisir une méthode apte à réaliser le but que je poursuivais. Renonçant à purifier l'amidon par simple immersion dans l'eau distillée ou par dialyse — deux procédés parfaitement inefficaces — ou par les méthodes de Nægeli, Brown, Lintner qui hydrolysent plus ou moins l'amidon en traitement, j'ai eu recours à la technique imaginée par Fernbach et Wolff (40), technique devenue d'un usage courant dans les recherches de brasserie.

Cette méthode consiste à traiter la fécule par l'acide chlorydrique à froid, de manière à dissoudre et entraîner les différentes bases qui font partie quasi intégrale du grain d'amidon. On obtient ainsi un amidon d'une pureté exceptionnelle dont s'est récemment servi M. Fouard (41) au cours de ses recherches physico-chimiques sur la constitution et l'état colloïdal de l'amidon.

On immerge pendant 30 minutes à 1 heure une certaine quantité de fécule de pomme de terre dans de l'acide chlorydrique à 1 °/₀₀ [1] à la température du laboratoire.

L'amidon est alors jeté sur un essoreur et lavé avec une abondante quantité d'eau distillée jusqu'au moment où les eaux de lavage ne donnent plus le moindre trouble par l'azotate d'argent et restent parfaitement neutres à l'hélianthine. Pour être sûr d'éliminer jusqu'aux dernières traces d'acide, je continuais le lavage bien au delà de ce terme.

L'amidon, essoré et grossièrement déshydraté sur papier filtre, est mis à dessécher pendant quelques jours, soit dans la cloche à vide, soit à l'étuve à 40 degrés [2].

L'amidon ainsi obtenu se présente sous la forme de fécule ordinaire, d'une blancheur éclatante. Par la chaleur, il se transforme avec la plus grande facilité, même à forte concentration, en un empois dont la fluidité et la semi-transparence contrastent avec l'opalescence et la viscosité de l'empois d'amidon ordinaire.

Une fois préparé, cet amidon ne devra pas être conservé dans des vases de verre, mais dans du papier sulfurisé, de préférence. C'est là un détail, insignifiant en apparence, mais dont l'importance est considérable, comme on le verra ultérieurement.

Inactivité de la salive dialysée vis-à-vis de l'amidon de Fernbach-Wolff.

Prenons cet amidon ainsi préparé ; faisons-en un empois à 5°/₀ et faisons agir sur lui de la salive dialysée.

Nous constaterons qu'après plusieurs heures de contact avec la diastase — plusieurs jours même, si on a opéré avec

[1] 3 cc. HCl pur pour °/₀₀.

[2] Fernbach et Wolff en le desséchant à 80° obtiennent un amidon soluble.

certaines précautions d'aseptie — l'empois d'amidon, loin de se liquéfier, est devenu de plus en plus visqueux, de plus en plus opaque ; *il est impossible de découvrir la moindre trace de sucre réducteur au moyen de la liqueur de Fehling.*

Une série d'expériences témoins pratiquées en même temps démontre :

1° Que la diastase est encore parfaitement active sur l'amidon ordinaire ;

2° Que la salive normale non dialysée saccharifie rapidement l'amidon de Fernbach-Wolff :

Salives		Amidons 5 %	Sucre
0 cc. 1 salive N [1]	+	10 cc. amidon	0 gr. 160
0 cc. 3 —	+	10 cc. —	0 gr. 280
0 cc. 1 salive D	+	10 cc. amidon F.-W.	0
0 cc. 3 —	+	10 cc. —	0
1 cc. —	+	10 cc. —	0
0 cc. 1 —	+	10 cc. amidon	0 gr. 013
0 cc. 3 —	+	10 cc. —	0 gr. 045
0 cc. 1 salive N	+	10 cc. amidon F.-W.	0 gr. 170

Par la netteté de ses résultats, cette expérience paraissait venir confirmer les idées qui avaient présidé à son organisation.

Il semblait qu'on n'avait eu qu'à priver scrupuleusement le milieu diastasique de sels pour mettre le ferment hors d'état d'agir. Par ce fait, disparaissait l'anomalie d'action qu'on constatait entre les amylases salivaire et pancréatique soumises à la dialyse ; toutes deux perdaient leur propriété par la dialyse, avec cette légère différence que la ptyaline

[1] Salive N = salive normale. Salive D = salive dialysée. Amidon = amidon ordinaire. Amidon F.-W. = amidon de Fernbach-Wolff.

nécessitait pour arriver à un degré d'inactivité absolue une absence d'électrolytes plus rigoureuse que ne le réclamait l'amylase pancréatique.

Action activante de certains électrolytes

I. Inefficacité des chlorures, bromures, sulfates, etc.

Cette interprétation est-elle acceptable ? Si l'inactivité de la ptyaline dialysée vis-à-vis de l'amidon de Fernbach-Wolff est un phénomène de même nature que l'inactivité de l'amylase pancréatique vis-à-vis de l'amidon ordinaire, il est de toute évidence que tous les agents qui réactivent cette dernière diastase devront avoir le même effet sur la première. En se reportant aux expériences de Bierry, Henri et Giaja, on voit que ce sont les chlorures alcalins et alcalino-terreux qui possèdent au plus haut degré la propriété de restituer à la diastase sa propriété amylolytique. Ces électrolytes ont-ils une action identique dans le cas que j'ai étudié ?

Amidon F.-W. à 5 °/₀		Salive D. —		Sels à 1 °/₀ —	Sucre —
5 cc.	+	0 cc. 4	+	1 cc. NaCl	0
5 cc.	+	0 cc. 4	+	1 cc. $CaCl^2$	0
5 cc.	+	0 cc. 4	+	1 cc. $MgCl^2$	0
5 cc.	+	0 cc. 4	+	1 cc. KBr	0
5 cc.	+	0 cc. 4	+	1 cc. NaBr	0
5 cc.	+	0 cc. 4	+	1 cc. NaI	0
5 cc.	+	0 cc. 4	+	1 cc. AzO^3K	0
5 cc.	+	0 cc. 4	+	1 cc. SO^4Na^2	0

Cette expérience, répétée un nombre considérable de fois, m'a toujours donné *le même résultat rigoureusement négatif*. Dans certains cas, dont je n'ai pas recherché le déterminisme expérimental, j'ai constaté que l'amidon des tubes contenant du chlorure de Ca ou de Mg présentait un degré plus ou moins accentué de liquéfaction [1] ; mais, même dans ces conditions, je ne pouvais déceler la moindre trace de réduction de la liqueur de Fehling, ajoutée cependant en très petite quantité afin de rendre la recherche plus sensible.

Les chlorures sont donc impuissants à réactiver la diastase inactive.

Le même résultat s'obtient en employant *les sels neutres d'acides minéraux*. Tour à tour, j'ai recherché l'action des sulfates, nitrates, sulfites, nitrites, bromures, iodures, fluorures alcalins; toujours la conclusion de ces expériences est demeurée négative.

On est donc amené à conclure logiquement que l'*inactivité de la pytaline dialysée relève d'une autre cause que de l'appauvrissement du milieu en chlorures ou autres sels neutres*. Ce fait est d'une nature différente de ceux observés jusqu'ici dans des conditions identiques, qui pourtant *à priori* présentaient avec lui une analogie frappante.

II. Influence des phosphates.

Une seconde hypothèse ouvrait une voie nouvelle à l'expérimentation. L'amidon de fécule, même d'une très grande

[1] M. Fouard a montré que le sodium, le calcium, exercent une action retardatrice très marquée sur la gélification de l'amidon colloïdal, sous forme de chlorures, et une action manifestement coagulante à l'état de sulfates, le même ion + coagulant ou stabilisant suivant l'ion — auquel il est combiné (*loco citato*).

pureté, contient, d'après les recherches de Fouard (43) de 3 à 4 grammes de matières minérales dont l'élément prépondérant est de l'acide phosphorique. Le traitement acide qu'on lui fait subir dans la technique de Fernbach-Wolff entraîne la plus grande partie de ces éléments minéraux. Si l'on se rappelle les recherches que j'ai mentionnées dans l'introduction de ce travail, concernant l'influence si considérable des phosphates, aussi bien, dans la fermentation alcoolique que dans la saccharification, il est permis de penser que c'est à la teneur si faible en phosphore de la matière amylacée ainsi traitée qu'est due l'inactivité de la diastase ; et cela d'autant plus que la dialyse a privé la diastase des phosphates que contient normalement la salive.

Les résultats signalés par Roger (39) étaient bien faits pour étayer cette hypothèse. On sait que traitant la salive par l'acétate d'urane, cet expérimentateur obtient une diastase inactive sur l'amidon, qui récupère son activité par adjonction de phosphates.

Guidé par cette idee directrice, j'ai recherché si dans les conditions où j'opérais, l'expérimentation pouvait confirmer ces vues ; en d'autres termes, j'ai étudié l'action de divers phosphates sur la saccharification de l'amidon de Fernbach-Wolff par la pytaline dialysée.

Influence des phosphates du commerce. — Mes premiers essais ont été effectués à l'aide de phosphates commerciaux dits chimiquement purs. De par leur provenance, je devrais en faire abstraction complète.

J'ai tenu cependant à rapporter brièvement quelques résultats ; j'estime que comparés à ceux qui suivront, ils attirent une fois encore l'attention sur les précautions à prendre en ce qui concerne la purification des substances dont on étudie l'influence sur les phénomènes diastasiques.

Dans le tableau suivant, j'ai résumé les résultats obtenus en faisant

agir de la salive dialysée sur l'amidon Fernbach-Wolff en présence de divers phosphates provenant de différentes maisons de produits chimiques.

Salive D		Amidon 4 %		Sels à 1 %		Eau D	Sucre
0 cc. 5	+	10 cc.			+	1 cc. 5	0
0 cc. 5	+	10 cc.	+	1 cc. NaCl	+	0 cc. 5	0
0 cc. 5	+	10 cc.	+	1 cc. $CaCl^2$	+	0 cc. 5	0
0 cc. 5	+	10 cc.	+	1 cc. PO^4H^2Na	+	0 cc. 5	0 gr. 090
0 cc. 5	+	10 cc.	+	1 cc. PO^4HNa^2	+	0 cc. 5	0 gr. 120
0 cc. 5	+	10 cc.	+	1 cc. PO^4Na^3	+	0 cc. 5	0
0 cc. 5	+	10 cc.	+	1 cc. $PO^4(AzH^4)$	+	0 cc. 5	0 gr. 090
0 cc. 5	+	10 cc.	+	1 cc. $(PO^4)^2H^4Ca$ [1]	+	0 cc. 5	traces

Cette expérience semblait apporter une confirmation de grande valeur aux vues de Roger en démontrant que les phosphates, sous n'importe quelle forme chimique (à l'exception du phosphate tribasique dont l'énorme alcalinité inhibe toute activité diastasique) et indépendamment des propriétés basiques inhérentes à chacun d'eux étaient les agents réactivants par excellence de la ptyaline dialysée.

J'ajoute immédiatement que les arséniates, les citrates, sels tous deux tribasiques, et le phosphore sous forme de glycérophosphate commercial jouissent de propriétés identiques.

Je n'insiste pas sur les considérations et idées générales qu'on pouvait émettre à la suite de ces faits.

Les résultats que l'on obtient dès que l'on expérimente avec des phosphates rigoureusement purs ruinent immédiatement toute hypothèse concernant le rôle prétendu spécifique du phosphore. A cette sorte d'interprétation, *ils forcent à substi-*

[1] L'inactivité du phosphate bicalcique s'explique aisément par sa solubilité très instable.

tuer une explication qui repose sur l'influence DE LA RÉACTION DE MILIEU *sur les processus enzymatiques.*

Influence des phosphates purs. — J'indiquerai d'abord les techniques qui m'ont servi à préparer le phosphate monosodique, ou phosphate primaire, ou phosphate acide, et le phosphate bisodique, ou phosphate secondaire, ou phosphate neutre.

Le phosphate monosodique PO^4H^2Na a été obtenu en versant dans de l'acide phosphorique pur à 60° de la soude concentrée jusqu'à réaction alcaline à l'hélianthine ; on ajoute alors une petite quantité d'acide phosphorique de manière à faire virer nettement l'indicateur au rouge, caractéristique de la réaction acide.

A cette solution concentrée de PO^4H^2Na, on ajoute un excès d'alcool à 96° : au bout de quelques heures, le sel se dépose en abondants cristaux. Après séparation de la partie liquide, on les remet en solution dans l'eau et on fait recristalliser dans l'alcool. Après trois à quatre traitements identiques, on essore les cristaux, et on les dessèche dans la cloche à vide. On obtient ainsi du phosphate monosodique, sans eau de cristallisation, fortement acide à la phénolphtaléine, mais parfaitement neutre à l'hélianthine.

J'ai préparé de la même manière le phosphate bisodique, en saturant de la soude concentrée par l'acide phosphorique jusqu'à réaction acide à la phénolphtaléine. On ajoute alors une petite quantité de soude de manière à faire virer légèrement mais franchement l'indicateur au rouge. Le phosphate qui cristallise par simple refroidissement dans un tel milieu est le phosphate bisodique. Après cristallisations successives, on le dessèche à l'air, pendant plusieurs jours. On obtient ainsi un sel qui ne contient plus que deux molécules d'eau de cristallisation. En solution aqueuse, il est alcalin à l'hélianthine ; mais contrairement aux traités de chimie qui indiquent ce sel comme neutre à la phénolphtaléine, les recherches récentes de SOERENSEN (49), ont établi qu'il devait être *légèrement mais franchement alcalin* à cet indicateur. C'est cette réaction que présentait le phosphate bisodique que j'ai obtenu.

Dans le cours des expériences suivantes, les phosphates étaient en solution $\frac{N}{15}$.

Lorsqu'on étudie l'influence de ces sels ainsi préparés, chimiquement purs, sur la saccharification de l'amidon, Fernbach-Wolf, par la ptyaline, on observé que *seul est doué de propriétés activantes le phosphate bibasique neutre. Le phosphate monobasique, loin d'être favorisant, se comporte comme un agent inhibiteur.*

Voici deux exemples pris au hasard entre les multiples expériences que j'ai effectuées à ce sujet :

Salive D.		Amidon 3 %		Phosphates	Sucre
0 cc. 2	+	10 cc.	+	0 cc. 5 PO^4H^2Na	0
0 cc. 2	+	10 cc.	+	1 cc. PO^4H^2Na	0
0 cc. 2	+	10 cc.	+	0 cc. 5 PO^4HNa^2	0 gr. 030
0 cc. 2	+	10 cc.	+	1 cc. PO^4HNa^2	0 gr. 042
0 cc. 2	+	10 cc.	+	1 cc. Eau	0
0 cc. 5	+	15 cc.	+	1 cc. Eau	0
0 cc. 5	+	15 cc.	+	1 cc. NaCl $\frac{N}{15}$	0
0 cc. 5	+	15 cc.	+	1 cc. PO^4H^2Na	0
0 cc. 5	+	15 cc.	+	1 cc. PO^4HNa^2	0 gr. 080

Dans quelques expériences, j'ai eu l'occasion d'observer l'influence sur le taux de la saccharification de doses progressivement croissantes de PO^4HNa^2, mais je n'ai pas fait de ce point une étude méthodique. J'ai constaté : 1° que des *quantités extrêmement minimes* de ce sel sont déjà capables d'activer la ptyaline (0 gr. 005 %) ; 2° qu'à mesure que croît la concentration du sel la saccharification se fait plus intense jusqu'à un optimum (0 gr. 030 %) ; 3° qu'à partir de cette concentration il y a inhibition progressive jusqu'à l'arrêt total aux environs de 0 gr. 64 %.

Salive D		Amidon		$PO_4HNa_2\frac{N}{15}$	Sucre
—		—		—	—
0 cc. 4	+	10	+	0 cc. 05	0 gr. 015
0 cc. 4	+	10	+	0 cc. 1	0 gr. 050
0 cc. 4	+	10	+	0 cc. 3	0 gr. 080
0 cc. 4	+	10	+	0 cc. 5	0 gr. 040
0 cc. 4	+	10	+	1 cc.	0 gr. 030
0 cc. 4	+	10	+	2 cc.	0 gr. 010
0 cc. 4	+	10	+	3 cc.	indosables par la méthode
0 cc. 4	+	10	+	4 cc.	id. id.
0 cc. 4	+	10	+	6 cc.	0

La quantité de phosphate, qui conditionne la saccharification optima est indépendante, dans de certaines limites, de la quantité de diastase sur laquelle on opère, mais dépend étroitement, au contraire, du volume d'empois d'amidon ajouté ainsi que de la concentration de cet empois. Ainsi, en opérant sur des empois à 1 gr., 2 gr., 3 gr. et 5 gr. °/₀, à volumes égaux on voit que la quantité de $PO^4\ HNa^2$ activante optima pour l'amidon à 1 °/₀ est loin d'être la quantité optima pour l'amidon à 5 °/₀.

On entrevoit déjà par là que la substance diastasique dans de telles réactions n'est pas la seule à exercer une influence dans le phénomène et que l'état de la substance amylacée à transformer doit être pris au moins en égale considération.

Ainsi qu'il était naturel de le penser, on obtient des résultats identiques avec les citrates monosodique et bisodique purs ; le citrate bisodique jouit de propriétés activantes très marquées dont est privé le citrate monosodique.

III. Influence activante des alcalins.

L'ensemble de ces expériences suggère immédiatement une nouvelle interprétation, toute différente de la précédente, où les phosphates n'interviennent plus par leur nature propre, mais par la réaction qu'ils communiquent au milieu dans lequel agit la diastase.

Pour que cette explication puisse être adoptée, il faut démontrer que tous les sels alcalins se comportent comme le phosphate bisodique, c'est-à-dire sont capables de réactiver la ptyaline inactive sur l'amidon de Fernbach-Wolff. Les recherches les plus récentes — pour ne citer que celles-là — de Guyénot, Slosse et Limbosch avaient établi l'influence manifestement inhibante des carbonates et bicarbonates, même à très faible concentration. De même, c'est une notion répandue que de minimes quantités de soude sont contraires à la saccharification. Ces expériences avaient, par conséquent, peu de chance de réussir.

Les faits m'ont cependant prouvé catégoriquement le contraire : Dans les conditions d'expérimentation où j'ai opéré, c'est-à-dire en faisant agir de la salive dialysée sur l'amidon de Fernbach-Wolff, j'ai vu tour à tour que les carbonates et bicarbonates de soude, de potasse, la soude elle-même étaient doués de propriétés activantes considérables. Mais il est nécessaire, pour constater ce fait, de n'opérer qu'avec des quantités extrêmement minimes de ces corps, le moindre excès produisant un effet inverse, en inhibant immédiatement la saccharification, tant sont sensibles aux réactions de milieu les diastases purifiées.

Lorsqu'on ajoute à des tubes contenant de la salive dialysée et de l'amidon de Fernbach-Wolff des sels alcalins en proportions convenables, on voit presque immédiatement l'amidon perdre son opalescence, devenir limpide et en quelques instants il s'est formé des quantités appréciables de sucre réducteur :

Salive D		Amidon 4 %		$CO_3Na_2\frac{N}{20}$	Sucre
0 cc. 2	+	10 cc.	+	0 cc. 1	0 gr. 081
0 cc. 2	+	10 cc.	+	0 cc. 3	0 gr. 004
0 cc. 2	+	10 cc.	+	0 cc. 5	0
0 cc. 2	+	10 cc.	+	1 cc.	0

Salive D		Amidon 4 %		$CONaH\frac{N}{20}$	Sucre
0 cc. 2	+	10 cc.	+	0 cc. 1	0 gr. 026
0 cc. 2	+	10 cc.	+	0 cc. 3	0 gr. 052
0 cc. 2	+	10 cc.	+	0 cc. 5	0 gr. 049
0 cc. 2	+	10 cc.	+	1 cc. à 1 %	0 gr. 019

Mêmes résultats avec les bases telles que la soude ; mais dans ce cas, l'influence activante pourrait passer inaperçue si au lieu d'expérimenter avec les solutions à $\frac{N}{20}$ on emploie des solutions décinormales :

Salive D		Amidon		$NaOH\frac{N}{10}$		$NaOH\frac{N}{20}$	Sucre apprécié par Fehling
0 cc. 2	+	10 cc.	+	0 cc. 1			Traces indosables.
0 cc. 2	+	10 cc.	+	0 cc. 5			0
0 cc. 2	+	10 cc.	+	1 cc.			0
0 cc. 2	+	10 cc.			+	0 cc. 1	Réduction intense.
0 cc. 2	+	10 cc.			+	0 cc. 5	Réduction intense.

IV. Sur la dissociation des propriétés liquéfiantes et saccharifiantes de l'amylase salivaire par les alcalins.

Au cours de ces recherches sur l'action des sels alcalins, j'ai eu l'occasion de constater quelques points intéressants sur la dissociation des propriétés liquéfiante et saccharifiante de l'amylase salivaire.

On s'accorde généralement aujourd'hui à désigner sous le nom d'amylase un ensemble de diastases qui, agissant sur l'amidon à l'état d'empois, le font passer à l'état soluble, de dextrines et finalement de maltose. Les recherches les plus récentes ont, de plus, montré que « dans cet ensemble il faut distinguer au moins trois diastases différentes, une diastase liquéfiante qui solubilise l'amidon, une diastase dextrinisante qui fait passer l'amidon soluble à l'état de dextrines et une diastase saccharifiante proprement dite qui transforme les dextrines par fixation d'eau en maltose » (Fernbach (43).

Il est facile de dissocier dans l'extrait de malt l'action de la diastase liquéfiante et de la diastase saccharifiante. Pottevin (44), a en effet montré que le chauffage à 80° pendant 35 minutes détruit la propriété saccharifiante et laisse persister une grande partie de la propriété liquéfiante.

Inversement, Fernbach et Wolff (45) ont vu que l'extrait d'orge non germé jouissait de la propriété de saccharifier l'amidon soluble, mais était incapable de liquéfier l'amidon sous forme d'empois.

Aucun fait semblable, à ma connaissance du moins,

n'avait été signalé avec les amylases d'origine animale. J'ai précisément *constaté* que *l'adjonction de sels alcalins en proportions déterminées permet de laisser subsister la propriété liquéfiante tout en inhibant totalement la propriété saccharifiante :*

Salive D.	Amidon 3 °/₀	NaOH N/10	Sucre	Liquéfaction
—	—		—	—
0 cc. 2	10 cc.	0 cc. 1	Traces	Complète
0 cc. 2	10 cc.	0 cc. 5	0	Complète
0 cc. 2	10 cc.	1 cc.	0	0

Salive D. 1	Amidon 4 °/₀	CO_3Na_2 N/20	Sucre	Liquéfaction
—	—		—	—
0 cc. 2	10 cc.	0 cc. 1	0 gr. 081	Complète
0 cc. 2	10 cc.	0 cc. 3	0 gr. 004	Complète
0 cc. 2	10 cc.	0 cc. 5	0	Complète
0 cc 2	10 cc.	1 cc.	0	Complète

Ce fait, intéressant en lui même, mérite surtout d'être signalé, en passant, par sa portée générale ; il montre, en effet, qu'une propriété inhérente aux amylases d'origine végétale se retrouve aussi dans les amylases d'origine animale. C'est là un argument de plus que peuvent invoquer ceux qui, avec Pugliese (46), pensent que toutes les amylases, aussi bien d'origine animale que d'origine végétale, sont identiques et que les quelques différences qu'elles manifestent sont dues aux impuretés qui les accompagnent.

On peut maintenant résumer tous les résultats que

[1] Cette expérience est déjà rapportée plus haut. Je la complète ici en y ajoutant l'état de la liquéfaction de l'amidon.

nous a fournis l'étude de l'influence des phosphates, des sels alcalins, des bases, sur la saccharification de l'amidon Fernbach - Wolff par l'amylase salivaire dialysée :

1° *Les phosphates monobasiques sont non seulement inaptes à réactiver la diastase mais encore inhibants de la saccharification* ;

2° *Les phosphates neutres, bibasiques, sont doués de propriétés activantes très marquées. Nettement actifs à l'état de traces* (0 gr. 005 °/₀ *et même moins sans doute*) *ils deviennent de plus en plus activants jusqu'à ce que leur concentration dans le milieu atteigne le taux de* 0 gr. 030 °/₀. *Leur action diminue avec les concentrations croissantes ; ils deviennent inactifs à partir de la concentration de* 0 gr. 65 °/₀ ;

3° *Tous les sels alcalins (carbonates, bicarbonates), les bases (soude, potasse) jouissent de la même propriété que les phosphates neutres. Actifs à l'état de traces, leur optimum d'action se trouve à la concentration de* 0 gr 005 °/₀ *environ pour* CO^3Na^2, 0 gr. 009 *environ pour* CO^3NaH *et* 0 gr. 001 °/₀ *pour* $NaOH$.

4° *Le carbonate de Na employé à concentration 5 à 10 fois plus élevée que celle à laquelle il est activant, fait disparaître la propriété saccharifiante pour ne laisser subsister dans son intégrité à peu près normale que la propriété liquéfiante.*

V. Influence activante des oxalates neutres, formiates acétates, etc.

Nous pourrions, d'ores et déjà, tenter d'établir une interprétation du fait, pour le moins inattendu, de l'activation d'une amylase par les alcalins, alors que jusqu'ici toutes les données accumulées depuis les recherches de KJELDHAL attribuaient ce rôle aux acides.

Cependant, pour plus de précision, il faut rapporter quelques expériences qui semblent compliquer le problème, déjà pourtant assez obscur.

Au cours d'essais de réactivation par différents sels neutres, j'ai expérimenté l'action de certains sels d'acides organiques, m'attendant à les trouver dépourvus de toute activité (je rappelle incidemment que dans les expériences de BIERRY, HENRI et GIAJA, ils se montraient inactifs). C'est précisément un résultat inverse que j'ai trouvé. Employés à la dose de 1 cc. d'une solution à 1 %, les acétates, formiates, oxalates neutres, tartrates de sodium et de potassium, ont été d'excellents agents de réactivation (notamment les formiates et acétates). L'activité de l'oxalate neutre, déjà nette à cette concentration, devient aussi considérable que celle des autres sels organiques pour une concentration double ou triple.

Je n'ai pas fait de recherches systématiques sur leur influence activante en raison de leur concentration ; mais j'ai tout lieu de penser qu'on pourrait obtenir avec eux des saccharifications aussi intenses qu'avec les alcalins, en les ajoutant en proportions convenables.

Tous les sels dont je me suis servi étaient neutres à la

phénolphtaléine. En présence de cet indicateur, ils n'y déterminaient le moindre changement. 1 goutte de $NaOH \frac{N}{20}$ faisait virer au rouge: 1 goutte de $SO^4H^2 \frac{N}{20}$ ramenait à la teinte primitive.

VI. Inactivité de l'amylase pancréatique sur l'amidon Fernbach-Wolff.

Des résultats identiques en tous points à ceux que je viens de signaler au cours de ce chapitre peuvent être obtenus lorsqu'on fait agir sur de l'amidon de Fernbach-Wolff, non plus de la salive dialysée mais du suc pancréatique de chien *dialysé contre l'eau distillée*.

Mais, immédiatement, une précision s'impose pour éviter une intrication de phénomènes disparates, n'ayant rien de commun entr'eux. Le suc pancréatique dont je me suis servi pour ce genre d'expériences n'avait point perdu entièrement son activité vis-à-vis de l'amidon ordinaire, la dialyse n'ayant pas été poussée assez à fond pour le dépouiller de tout pouvoir amylolytique. Certes, ce dernier avait diminué dans des proportions telles que cette diastase était moins active sur l'amidon ordinaire que la salive dialysée. Cependant, après deux heures de thermostat, elle déterminait la formation de sucre réducteur en quantité largement appréciable par la liqueur de Fehling.

Par conséquent, le cas du *suc pancréatique* est complètement assimilable, *dans ces conditions,* à celui de la salive. Même activité de l'une et l'autre de ces diastases vis-à-vis de

l'amidon ordinaire ; même rigoureuse *inactivité* vis-à-vis de l'amidon purifié par la technique de Fernbach-Wolff.

Dans les expériences de Bierry, Henri et Giaja le suc pancréatique dialysé, inactif sur l'amidon ordinaire, récupère son activité par adjonction de chlorures. Dans celles dont je m'occupe maintenant, le résultat est tout différent. En effet, le *suc pancréatique dialysé*, encore légèrement actif vis-à-vis de l'amidon ordinaire, *est rigoureusement inactif vis-à-vis de l'amidon purifié. L'adjonction de chlorures, bromures, iodures*, et en général de sels neutres, *reste sans effet activant. Au contraire, les phosphates neutres, les sels alcalins* — à la même concentration que celle indiquée plus haut pour la salive — *les acétates, oxalates, jouissent de propriétés activantes marquées.*

Si on se reporte à la note de Bierry et Giaja (26), on constate, non sans un certain étonnement, que *les sels qui dans leurs expériences étaient réactivants sont précisément inactifs dans les miennes* (chlorures, bromures, etc.), *et inversement que ceux qui sont actifs dans les miennes* (phosphates, carbonates, oxalates) *étaient inefficaces dans les leurs.*

La différence, semble-t-il, ne peut pas être plus tranchée, le désaccord plus profond.

Mécanisme de l'action activante des alcalins

Nous allons nous attacher à démontrer que l'inactivité du suc pancréatique et de la salive dialysés vis-à-vis de l'amidon de Fernbach-Wolff d'une part, et l'inactivité du suc pancréatique dialysé à fond vis-à-vis de l'amidon ordinaire sont deux

phénomènes de nature essentiellement différente et qui, pour cette raison, ne sauraient être influencés par les mêmes facteurs [1].

Celui-ci, nous le montrerons dans la suite, est dû à une modification apportée à la substance transformante ; celui-là, nous allons le voir, à une modification de la substance à transformer. L'un a pour cause une modification de l'activité diastasique, l'autre une modification de l'état chimique de l'amidon.

I. Modifications apportées à l'amidon par le lavage à l'acide chlorydrique.

Puisque la salive et le suc pancréatique dialysés, inactifs vis-à-vis de l'amidon de Fernbach-Wolff sont encore aptes à saccharifier l'amidon ordinaire ; puisqu'aucun sel neutre ne

[1] On peut mettre en évidence d'une façon frappante la diversité de ces deux cas expérimentaux. Au lieu de dialyser la salive ou le suc pancréatique contre l'eau distillée, dialysons-les contre de l'eau salée à 7 °/₀₀. Dans ces conditions tous les sels autres que le NaCl contenus dans le liquide diastasique s'élimineront au travers du septum de collodion ; seul y restera le chlorure de Na. La diastase ainsi traitée est naturellement très active vis-à-vis de l'amidon ordinaire (présence du chlorure de Na). Elle est, au contraire, rigoureusement inactive vis-à-vis de l'amidon de Fernbach-Wolff. Par adjonction de phosphates neutres, elle récupère son pouvoir vis-à-vis de lui.

Cette expérience, à elle seule, démontre l'influence qu'exerce la composition chimique de la substance amylacée sur le phénomène de l'amylolyse diastasique.

peut rendre à ces diastases leur pouvoir vis-à-vis de l'amidon purifié ; puisque, enfin, des traces de sels alcalins suffisent à leur restituer une partie de leur action, on est naturellement conduit à rechercher si le mode de traitement employé pour purifier l'amidon (lavage à HCl à froid) n'apporte pas à la constitution de la matière amylacée quelques modifications capables d'expliquer les faits plutôt inattendus que je viens de relater.

L'hypothèse d'un rôle actif joué par l'amidon dans ces expériences était, certes, la dernière à être prise en considération. Depuis que Fernbach et Wolff ont fait connaître le mode de préparation de cet amidon, soluble en même temps que purifié, d'innombrables recherches ont été faites avec son aide sur la saccharification diastasique et nul n'a jamais signalé que cet amidon fut inattaquable par des amylases. Récemment encore, M. Fouard (41) a fait de cette forme d'amidon une étude physico-chimique des plus remarquables dont il ressort que, ainsi traitée, la substance amylacée est *l'exemple du colloïde le plus pur que nous connaissions jusqu'à maintenant*. Il y avait donc peu de chance que les impuretés de l'amidon pussent être incriminées.

Malgré toutes ces raisons à priori, c'est dans cette voie seule que l'on peut trouver l'interprétation de mes expériences.

Quelles sont les modifications que fait subir à l'amidon son mode de purification par l'acide chlorydrique dilué ?

Physiquement, les grains d'amidon traités par l'HCl et désséchés sont en tous points comparables aux grains d'amidon normal. Même aspect macroscopique et, fait plus important, aspect microscopique identique. L'empois d'un tel amidon ne diffère de l'empois d'amidon normal que par sa faible viscosité. Le départ des sels de chaux et la mutation des phosphates sont la cause, comme

l'ont montré Fernbach et Wolff, de cette modification (47).

Au *point de vue chimique*, l'amidon de Fernbach - Wolff est de *l'amidon déminéralisé*. Au début de ce travail, j'ai rappelé que l'amidon ordinaire, même lorsqu'on utilise une fécule d'une extrême pureté, contient par kilogramme de 3 à 4 grammes de matières minérales dont l'élément prépondérant est de l'acide phosphorique. En dehors du phosphore, l'analyse des cendres permet d'y reconnaître de la silice, du manganèse, de la chaux, de la potasse, de la soude et enfin des bases indéterminées. Quand on traite l'amidon par l'HCl dilué, on élimine de la substance amylacée la plus grande partie de ces impuretés ; mais ainsi que l'a montré M. Fouard (42), à qui j'emprunte le tableau suivant, *il est impossible*, même après lavages acides répétés, d'obtenir un amidon complètement déminéralisé :

	Grammes de matières minérales pour 1000	Quantité de PO^4H^3 en P^2O^3 dans 1000	Quantité de P^2O^3 dans les matières minérales
Amidon ordinaire	3 gr. 310	1 gr. 390	42 %
Amidon traité 1 fois	1 gr. 950	0 gr. 955	48,9 %
— — 2 fois	1 gr. 715	0 gr. 853	49,7 %
— — 4 fois	1 gr. 260	0 gr. 822	64,5 %
— — 5 fois	1 gr. 240	8 gr. 810	65,2 %

Cette déminéralisation a très peu touché le taux de l'acide phosphorique, si on le compare à celui des autres éléments. Celui des matières minérales continue à baisser peu à peu, tandis que la proportion de l'acide phosphorique contenu dans le résidu minéral s'élève. En somme «le traitement de déminéralisation élimine les divers éléments

salins à titres variables, si bien que le résidu final est presque uniquement de l'acide phosphorique » [Fouard (42)]. « Ni le traitement à l'acide, ni les épuisements par l'eau n'ont pu éliminer les éléments engagés dans les composants normalement solubles ; les radicaux basiques eux-mêmes ont résisté en partie à l'entraînement. Les impuretés naturelles sont donc retenues avec la plus grande ténacité par l'amidon, comme si elles faisaient partie intégrante du granule et il faut considérer comme irréalisable leur séparation absolue d'un amidon chimiquement pur, contrairement à des affirmations répétées par ailleurs » [Fouard (42)]. C'est cette même constatation qu'exprimait récemment M. Malfitano (48) : « Nonobstant tous les traitements avec des réactifs appropriés, les grains d'amidon naturel retiennent toujours quelques millièmes de cendres, constitués surtout par des phosphates alcalino-terreux et de la silice ».

L'amidon de Fernbach-Wolff est donc un amidon déminéralisé, mais seulement *partiellement déminéralisé*. C'est là un point de la plus haute importance.

Sous quelle forme se trouve le phosphore dans cet amidon ?

Fernbach et Wolff constatent que l'empois d'amidon ordinaire présente une *réaction amphotère ;* c'est-à-dire qu'il est *acide à la phénolphtaléine* et *alcalin à l'hélianthine*. Cette réaction s'explique par les combinaisons chimiques que contracte le phosphore avec les bases. Dans le grain d'amidon se trouvent des *phosphates monobasiques* ou acides (acides à la phénolphtaléine) et des *phosphates bibasiques* ou neutres (alcalins à l'hélianthine).

Après traitement par l'HCl, l'amidon est encore acide à la phénolphtaléine mais, fait capital pour l'interprétation de mes expériences, il est *devenu neutre à l'hélianthine*, tout se passant comme si la totalité des phosphates secondaires de

l'amidon, disent Fernbach et Wolff, était passée à l'état de phosphates primaires (acides à la phénolphtaléine, mais neutres à l'hélianthine).

Ainsi l'amidon de Fernbach-Wolff est de l'amidon débarrassé de la majeure partie de ses impuretés minérales, donc déminéralisé, mais seulement *partiellement déminéralisé, renfermant encore une certaine quantité de phosphore combiné à diverses bases sous la forme de phosphates monobasiques,* phosphates dont la présence se révèle par l'acidité à la phénolphtaléine et la neutralité à l'hélianthine.

II. La réaction amphotère, condition nécessaire au fonctionnement des amylases.

Les particularités de cette forme d'amidon maintenant bien connues, on voit immédiatement sous quelle forme nouvelle se présente la question, sous quel jour différent apparaissent les résultats de mes expériences :

1° *La ptyaline et l'amylopsine, privées par la dialyse particulièrement des sels alcalins qui les accompagnent normalement* (CO^3K^2, CO^3KH, CO^3Na^2, CO^3NaH, PO^4HK^2), *sont dépourvues d'activité vis-à-vis d'un amidon partiellement déminéralisé dont les phosphates* (qui constituent la majeure partie des impuretés persistantes) *ont été amenés à l'état de phosphates monobasiques.*

En d'autres termes, *les amylases salivaire et pancréatique neutralisées par la dialyse sont inactives vis-à-vis d'un amidon neutre à l'hélianthine.*

2° *L'adjonction, soit* directement *de phosphates bibasiques soit de sels alcalins qui reconstituent des phosphates bibasiques aux dépens des phosphates monobasiques, restitue à la diastase la possibilité d'agir.*

En d'autres termes, *l'adjonction de sels alcalins qui restituent à l'amidon son alcalinité à l'hélianthine et par conséquent* SA RÉACTION AMPHOTÈRE PRIMITIVE, *rend son activité à la diastase.*

De prime abord, il semble que la réactivation conditionnée par les sels neutres organiques (oxalates, acétates, etc.), ne soit pas susceptible d'une telle interprétation. Au début de ces recherches, j'ai quelque peu hésité sur la signification de ces expériences, parce que je ne faisais appel qu'aux indications tirées de la réaction à la phénolphtaléine. Mais du jour où j'ai pris en considération les renseignements fournis par l'hélianthine — cet indicateur que FERNBACH a montré être si précieux dans les recherches de ce genre — j'en ai immédiatement saisi la portée. En effet, si l'on examine la manière dont se comportent les solutions de ces différents sels envers l'orangé, on observe que *ceux qui sont doués de propriétés activantes envers les amylases sont légèrement mais franchement alcalins à cet indicateur*, quoique parfaitement neutres à la phénolphtaléine.

Dès lors leur influence activante s'interprète de la même façon que celle des sels alcalins : *ils apportent avec eux des traces d'alcalinité qui suffisent à refaire passer une partie des phosphates acides à l'état de phosphates neutres*, en d'autres termes *à restituer à l'amidon sa réaction amphotère primitive.*

Une dernière interprétation de ces faits est encore possible, d'ordre physico-chimique, basée sur la théorie de la dissociation ionique des sels en solution.

SOERENSEN (49) a récemment montré que les acides n'in-

terviennent dans les actions diastasiques où ils sont nécessaires que par la concentration ionique en ions H qu'ils établissent ; que d'autre part, le ferment acquiert son effet optimum lorsqu'il agit dans un milieu où l'on a établi une concentration ionique déterminée en ions — et cela indépendamment de l'acide employé. Dernièrement Vulquin (50) a étendu cette notion aux ferments des glycosides.

En ce qui concerne mes expériences, il est probable que la concentration ionique en ions H conditionnée par le phosphate acide de l'amidon Fernbach-Wolff est trop élevée pour permettre à la diastase d'agir. Par l'adjonction de phosphates neutres, on établit une nouvelle concentration ionique moins élevée en ions H, mais plus élevée en ions OH, favorable à l'activité de la diastase [1].

III. Interprétation générale.

J'attire l'attention sur ce fait que dans cette interprétation on ne fait intervenir à aucun moment la diastase. *Toutes les modifications qui ont influencé la saccharification ont exclusivement porté sur l'amidon*, ou plus exactement sur les impuretés de l'amidon, auxquelles il doit ses réactions.

On ne saurait donc parler dans tous ces faits de l'activation

[1] C'est dans cette voie que j'avais cherché à interpréter ces faits. Par suite de difficultés matérielles, je n'ai pu mener à bien la suite de ces expériences. Je les reprendrai ultérieurement.

d'une diastase inactive par des sels alcalins, comme j'ai été obligé de le faire jusqu'à maintenant[1].

L'ensemble des considérations précédentes doit faire adopter un autre langage qui assigne à ces phénomènes leur véritable signification. *Il s'agit, dans tous ces cas, de la substitution d'un milieu favorable à un milieu défavorable*, ou mieux *de la substitution d'une réaction de milieu favorable à une réaction de milieu inhibitrice au plus haut degré.*

Les sels alcalins, nous le voyons maintenant, n'agissent qu'en restituant à la matière amylacée sa composition chimique primitive, ou ce qui revient au même, sa réaction amphotère primitive. La diastase n'est pas prise en considération. D'une façon saisissante, en apparence paradoxale, on peut dire que les sels alcalins restituent à *la diastase* son activité, en restituant à l'*amidon* sa composition normale ; on voit par cette manière de s'exprimer que l'action sur la substance transformante n'est que la résultante de celle sur la substance à transformer.

La preuve expérimentale que les sels alcalins n'agissent que sur l'amidon peut être facilement fournie de la façon suivante :

On traite de l'amidon ordinaire par HCl de manière à obtenir l'amidon de Fernbach-Wolff, inattaquable par les amylases salivaire et pancréatique.

On lave cet amidon pendant 30 minutes dans unesolution de soude à 1°/$_{00}$ ou de PO^4HNa^2 à 1 °/$_0$ ou d'acétate de Na à 2 °/$_0$. On lave à l'eau distillée, on dessèche. *L'amidon ainsi obtenu est devenu spontanément saccharifiable par ces amylases.*

[1] En effet, par adjonction de sels alcalins, on ne fait que permettre à la diastase d'exercer son activité vis-à-vis d'un amidon sur lequel elle n'avait nulle prise ; et jamais on ne lui communique une activité supérieure à celle qu'elle a, après dialyse, sur l'amidon ordinaire.

CONCLUSIONS

Arrivé au terme de cette étude, nous sommes autorisé à conclure définitivement :

1° Que l'amidon dont les phosphates ont été amenés à l'état de phosphates monobasiques est insaccharifiable par les diastases salivaire et pancréatique purifiées par la dialyse.

2° Que l'adjonction de phosphates bibasiques, de sels alcalins, de sels organiques alcalins à l'hélianthine, lui restitue son aptitude à l'hydrolyse par ces diastases, en lui restituant sa réaction amphotère primitive ;

3° Que ce sont LES PHOSPHATES, *toujours présents, dans l'amidon qui conditionnent cette réaction amphotère, en l'absence de laquelle il ne peut être hydrolysé par ces diastases ;*

4° Que l'amidon, même le plus pur, apporte avec lui des traces d'impuretés (phosphore) dont on ne peut le débarrasser, impuretés qui exercent sur le processus diastasique une influence des plus considérables.

*
* *

L'ensemble de ces quelques résultats pourrait servir de base à de nombreuses et longues discussions concernant les

actions enzymatiques. Outre que cela sortirait du sujet que je me suis assigné, les limites de ce travail sont trop restreintes pour me permettre de le faire. Je me contenterai d'attirer l'attention, aussi succinctement que possible, sur les considérations générales qui en découlent.

I. Sur la sensibilité des diastases aux modifications de réaction de milieu.

Ces expériences mettent en lumière, de la façon la plus démonstrative, l'extraordinaire sensibilité que présentent les diastases purifiées à d'inappréciables changements de réaction de milieu, lorsqu'on les fait agir sur les substances elles-mêmes purifiées. Wolff, à la suite de ses recherches sur les oxydases, écrivait récemment (51) qu'il avait « acquis la certitude que de très petites différences de réaction insoupçonnées jusqu'ici peuvent avoir une influence capitale dans l'apparition ou l'absence d'un grand nombre de phénomènes diastasiques ». Certaines diastases hydrolysantes, les amylases, ne se comportent pas autrement, comme on le voit. L'adjonction de quelques gouttes d'une solution d'oxalate de Na à 1 % à de l'amidon purifié ne détermine aucune modification appréciable aux indicateurs colorés, comme je m'en suis rendu compte. Et pourtant, il a suffi de traces de ce sel pour faire apparaître dans le milieu une propriété qui, sans cet artifice, aurait été méconnue, la propriété amylolytique.

C'est sur cette sensibilité aux réactions de milieu que Fernbach, en 1902, appelait l'attention. « Quand ces variations, disait-il, sont notables, l'action de certaines diasta-

ses peut-être paralysée au point que la présence de ces diastases paraît douteuse » (52). Nous savons aujourd'hui — et les faits que j'apporte en sont une preuve de plus — que ces variations n'ont pas besoin d'être notables, et que, même extraordinairement petites, elles sont capables d'inhiber totalement la manifestation de propriétés diastasiques.

Une observation que j'ai faite à deux reprises est particulièrement démonstrative : ayant conservé de l'amidon de Fernbach-Wolff dans un flacon de verre pendant trois mois, j'ai constaté qu'après ce laps de temps cet amidon était susceptible d'être hydrolysé — quoique légèrement — par la salive dialysée. Or, au moment de sa mise en flacon, la diastase était rigoureusement inactive à son encontre.

Je ne puis expliquer ce fait que par l'alcalinité que le verre a dû céder à la longue à l'amidon[1] ; d'où cette recommandation, si l'on veut avoir des résultats absolument nets, de conserver l'amidon dans du papier et non dans des flacons de verre.

II. Influence des impuretés de l'amidon sur sa saccharification.

Il ressort, en second lieu, de cette série d'expériences, que dans les phénomènes diastasiques — et particulièrement dans les processus amylolytiques — *l'état de la substance*

[1] Je n'ai pu observer la moindre modification dans la manière de se comporter de cet amidon vis-à-vis de la phtaléine et l'hélianthine, la trace d'alcalinité qui a suffi à le sensibiliser étant inappréciable par ces méthodes.

à transformer joue un rôle aussi considérable que la substance qui transforme, c'est-à-dire la diastase.

D'innombrables expérimentateurs ont étudié l'influence d'un grand nombre de substances chimiques sur la saccharification diastasique de l'amidon, sans prendre en considération les perturbations énormes que pouvaient apporter à leurs recherches les diverses variétés d'amidon par eux mis en œuvre (amidon ordinaire, amidon soluble, amidon acétique, amidon chlorydrique, etc., etc). On a trop considéré l'amidon comme un corps inerte et passif, dans le phénomène de la saccharification. Je pense que mes expériences sont de nature à attirer l'attention sur le rôle actif qu'il est appelé à jouer. Comme l'a écrit Fernbach (43), dans un article consacré à l'analyse des notes que j'ai publiés à ce sujet (53-54-55), il ne fait pas de doute « que l'amidon le plus pur qu'on a pu se procurer pour les expériences sur la saccharification apporte lui-même des substances qui ont sur le phénomène une influence très marquée. L'inactivité des amylases d'origine animale sur l'amidon de Fernbach-Wolf — considéré comme le colloïde le plus pur connu — n'est-il pas la preuve la plus convainquante de cette affirmation? Dans ce cas peut-on mettre en doute l'influence primordiale de la minime quantité de phosphore contenu dans la substance amylacée sur l'activité diastasique?

Si jusqu'ici cette notion a été peu précisée, c'est que la saccharification de l'amidon a été à peu près exclusivement étudiée au moyen de l'amylase du malt. Et cela nous amène à une dernière considération, et non des moins intéressantes, au sujet de la prétendue identité des amylases.

III. Sur la diversité des amylases.

Parceque l'on a retrouvé dans les autres amylases les trois propriétés fondamentales que l'on a étudiées sur le malt, à savoir la propriété liquétiante, la propriété dextrinisante, la propriété saccharifiante, on a généralement conclu que toutes les amylases, malgré leur diversité d'origine, étaient identiques.

Sans doute, certains auteurs s'étaient élevés contre cette manière de voir — notamment Hammarsten — en objectant, par exemple, qu'elles ne se comportaient pas toutes de la même manière vis-à-vis de la chaleur, l'amylase salivaire trouvant son maximum d'activité à 46° (Kjeldahl) 30°-45° (Roberts) 40°-45° (Chittenden et Martins) alors que l'amylase du malt ne le trouve qu'à 50° (Lindtner et Eckardt, Srilagyi).

Mais Pugliese (46) a réfuté cet argument en montrant que ces différences d'action sont dues à des causes extérieures au ferment. Si l'on opère sur des amylases extraites de la salive, de l'Eurotium orizæ, du malt, toutes trois purifiées par précipitation par l'alcool, on observe bien des différences dans la vitesse de la saccharification, mais une fois qu'elle est terminée, le pouvoir réducteur est le même pour ces diastases, quelle que soit la température où on les a portées au préalable. Si on se place dans des conditions identiques, on arrive à conclure que les amylases sont identiques et que les différences qu'elles manifestent sont dues aux corps qui les accompagnent.

Un autre argument de grande valeur plaide encore en faveur de l'identité des amylases : l'identité d'action des acides. Je ne fais que rappeler les observations de Kjeldhal,

de Fernbach, d'une part, de SydneyCole, de l'autre, d'après lesquelles de petites traces d'acides augmentent considérablement l'action des amylases, aussi bien d'origine végétale (malt) qu'animale (ptyaline, amylopsine.)

Aussi cette notion a-t-elle été généralement admise comme l'atteste la phrase suivante empruntée à un précis de chimie physiologique, que sa clarté et sa précision ont rendu universel : « Ces deux diastases (malt-salive) agissant dans les mêmes conditions de température et de milieu, et déterminant la formation des mêmes produits de transformation, peuvent être considérées comme identiques pratiquement » [Arthus (56).]

Dans un article récent, M. Fernbach a reconnu « que l'on s'était peut-être un peu trop hâté de généraliser et d'étendre les faits observés (avec le malt) aux amylases ayant d'autres origines. » Cette dernière affirmation, ajoutait-il en faisant allusion à mes recherches, trouve un appui très solide dans certains travaux récents (43).

En effet, j'ai répété avec l'extrait de malt dialysé et l'amidon de Fernbach-Wolff des expériences calquées sur celles que j'avais faites avec la salive et le suc pancréatique. J'ai vu que la *dialyse ne prive jamais la diastase de son activité vis-à-vis de cet amidon*, mais surtout que *l'adjonction de phosphates neutres est nuisible à son action, alors que les phosphates acides ne sont nullement gênants.* Ce résultat ne fait que confirmer les faits établis par Fernbach dès 1899[1].

[1] Rien ne prouve, du reste, que si l'on arrivait à dialyser assez à fond l'extrait de malt, on n'arriverait pas à des résultats identiques à ceux obtenus avec la salive. Malheureusement, il est impossible d'obtenir une telle purification — comme l'avaient vu, du reste, Bierry, Henri et Giaja. Je continue ces recherches avec des techniques nouvelles plus efficaces, mais mes expériences ne sont pas encore assez nombreuses pour que je puisse tabler sur elles.

Malt D.		Amidon 3%		PO^4H^2Na		PO^4HNa^2		Eau	Sucre pour %
0 cc. 3	+	10 cc.	+	0 cc. 1			+	2 cc. 9	6 gr. 6
0 cc. 3	+	10 cc.	+	0 cc. 5			+	2 cc. 5	9 gr. 5
0 cc. 3	+	10 cc.	+	1 cc.			+	2 cc.	10 gr.
0 cc. 3	+	10 cc.	+	2 cc.			+	1 cc.	9 gr. 9
0 cc. 3	+	10 cc.			+	0 cc. 1	+	2 cc. 9	9 gr. 5
0 cc. 3	+	10 cc.			+	0 cc. 5	+	2 cc. 5	7 gr. 4
0 cc. 3	+	10 cc.			+	1 cc.	+	2 cc.	4 gr. 3
0 cc. 3	+	10 cc.			+	2 cc.	+	1 cc.	3 gr. 3
0 cc. 3	+	10 cc.					+	3 cc.	9 gr. 9

Ainsi, lorsqu'on se place dans des conditions d'expérimentation plus rigoureuses que celles qu'on avait réalisées jusqu'ici, on observe que les amylases d'origine animale ne sauraient en aucune façon fonctionner en milieu neutre à l'hélianthine, milieu où précisément l'amylase du malt trouve son optimum d'action (Fernbach et Wolff 57).

La radicale opposition qui se manifeste dans les réactions de milieu que réclament pour traduire leur activité ces deux catégories d'amylases nous autorise à conclure nettement *à la non identité des amylases d'origines animale et végétales* et, de ce fait, ouvre à nouveau un débat qui semblait pourtant vidé.

DEUXIÈME PARTIE

CHLORURES ET AMYLASES

CHAPITRE PREMIER

DE L'INFLUENCE DES CHLORURES SUR L'ACTIVITÉ DES AMYLASES PANCRÉATIQUE ET SALIVAIRE

L'influence de certains électrolytes neutres et en particulier des chlorures alcalins et alcalino-terreux sur l'activité des diastases amylolytiques peut se mettre clairement en évidence par des expériences dont la technique essentiellement simple n'exige pas l'emploi de la dialyse. On se propose d'inactiver l'amylase, non plus en la privant de ses sels, mais en la diluant dans de grandes quantités d'eau distillée, ce qui produit le même résultat. Dans ces conditions, les électrolytes contenus dans le liquide diastasique primitif subissent une dilution telle que leur quantité encore présente dans 1 cc., par exemple, de cette nouvelle solution diastasique peut être

considérée comme pratiquement négligeable. De plus, la concentration saline diminue encore dans des proportions notables du fait qu'on met un volume réduit de diastase diluée en présence d'un volume considérable d'empois d'amidon préparé lui-même à l'eau distillée.

Pratiquement, on trouve facilement le titre d'une solution dont un volume déterminé (1 à 2 cc.) reste pour un temps donné (20 à 30 minutes) sans action saccharifiante vis-à-vis de l'empois d'amidon.

On a ainsi réalisé l'inactivation d'une diastase par une méthode rapide, facile à exécuter, qui combine l'action de deux facteurs : la dilution, la déminéralisation.

Veut-on maintenant étudier l'influence d'un électrolyte, le chlorure de sodium, par exemple, sur l'activité de l'amylase? On prépare une dilution de diastase au titre identique à la précédente, non plus dans l'eau distillée, mais dans de l'eau salée (prenons l'eau physiologique à 9 ‰ pour fixer les idées) et on fait agir le même volume de diastase (qui dans le cas précédent était inactif) sur de l'empois d'amidon fait lui-même avec de l'eau salée à 9 %.

Si le chlorure de sodium est activant pour l'amylase, la saccharification produite sous son influence sera appréciable par la liqueur de Fehling ; la quantité de maltose formée mesurera directement son action activante.

On opèrera de la même manière pour tous les sels dont on veut étudier l'effet, en diluant la diastase dans la même solution de sel qui servira à préparer l'empois.

C'est à Delezenne et Pozerski, qui dès 1904 avaient entrepris des études, restées inédites, sur l'influence des électrolytes sur l'amylase pancréatique, que l'on doit le plan général de ces expériences. Il est même curieux de constater que des recherches n'aient point été entreprises par ailleurs à l'aide d'une technique aussi aisée que démonstrative.

Je dois à leur extrême amabilité — dont je les remercie vivement — de pouvoir extraire de leur cahier de 1905, les quelques expériences que je rapporte ici.

Suc pancréatique dilué à 1 °/₀ et fécule à 0 gr. 5 °/₀.

			Sucre
1.	S. P. eau D [1]	1 cc.	Traces indosables.
	Amidon eau D	50 cc.	
2.	S. P. eau P	1 cc.	0 gr. 016
	Amidon eau P	50 cc.	

Suc pancréatique 1 °/₀ et fécule 0 gr. 5 °/₀.

1.	S. P. eau D	1 cc.	0 gr. 039
	Amidon eau P	50 cc.	
2.	S. P. eau P	1 cc.	0 gr. 043
	Amidon eau P	50 cc.	
3.	S. P. eau D	1 cc.	Traces indosables.
	Amidon eau D	50 cc.	
4.	S. P. eau P	1 cc.	0 gr. 043
	Amidon eau D	50 cc.	

Suc pancréatique 1 °/₀. Fécule à 0 gr. 5 °/₀.

			20 minutes	2 heures
1.	S. P. eau D	1 cc.	Traces indosables	0 gr. 017
	Amidon eau D	50 cc.		
	eau D	1 cc.		
2.	S. P. eau P	1 cc.	0 gr. 041	0 gr. 086
	Amidon eau D	50 cc.		
	eau D	1 cc.		

[1] Eau D = eau distillée. Eau P = eau physiologique.

			20 minutes	2 heures
3.	S. P. eau D 1 cc. Amidon eau D 50 cc. eau P 1 cc.		0 gr. 042	0 gr. 104

Ces résultats sont assez démonstratifs sans qu'il soit besoin d'y insister longuement ; non seulement la présence de chlorure de sodium renforce d'une manière très considérable (40 ou 50 fois environ) l'activité diastasique, mais surtout — et c'est là le point le plus intéressant — elle permet la manifestation de la propriété diastasique qui, sans cet électrolyte, serait demeurée à l'état latent, du moins dans ces conditions.

On obtiendrait des résultats identiques avec tous les chlorures alcalins ou alcalino-terreux, et selon toute vraisemblance avec les bromures, iodures des mêmes métaux.

Delezenne et Pozerski ont essayé, mais en vain, d'activer la diastase avec des cristalloïdes non électrolytes, la saccharose, par exemple.

Suc pancréatique (recueilli depuis 6 jours) à 1/50. Saccharose à 7 gr. 2 °/₀₀. NaCl à 8 gr. 5 °/₀₀.

1.	S. P. eau D 1 cc. Amidon eau D 50 cc. Saccharose 2 cc.	Traces indosables.
2.	S. P. eau D 1 cc. Amidon eau D 50 cc. Saccharose 1 cc. 5	Traces indosables.
3.	S. P. eau D 1 cc. Amidon eau D 50 cc. Saccharose 1 cc.	Traces indosables.
4.	S. P. eau D 1 cc. Amidon eau D 50 cc. NaCl 2 cc.	0 gr. 064

5.	S. P. eau D	1 cc.	
	Amidon eau D	50 cc.	0 gr. 078
	NaCl	1 cc. 5	
6.	S. P. eau D	1 cc.	
	Amidon eau D	50 cc.	0 gr. 071
	NaCl	1 cc.	

Sur les conseils de M. Delezenne, j'ai répété des expériences analogues avec la diastase salivaire.

La salive est diluée à 1/200 respectivement dans l'eau distillée, dans des solutions de NaCl N/15, de PO^4H^2Na N/15 et PO^4HNa^2 N/15.

1.	Salive Eau D	5 cc.	Traces.
	Amidon	10 cc.	
2.	Salive NaCl	5 cc.	0 gr. 031
	Amidon	10 cc.	
3.	Salive PO^4H^2Na	5 cc.	Traces indosables.
	Amidon	10 cc.	
4.	Salive PO^4HNa^2	5 cc.	Traces indosables.
	Amidon	10 cc.	

Mêmes dilutions de salive que précédemment.

1.	Salive Eau D	0 cc. 5	Traces indosables.
	Amidon	10 cc.	
2.	Salive NaCl	0 cc.	0 gr. 012
	Amidon	10 cc.	
3.	Salive PO^4H^2Na	0 cc. 5	0
	Amidon	10 cc.	

4.	Salive PO^4HNa^2	0 cc. 5	0
	Amidon	10 cc.	
5.	Salive PO^4H^2Na	0 cc. 2	0 gr. 014
	Salive PO^4HNa^2	0 cc. 2	
	Salive NaCl	0 cc. 1	
	Amidon	10 cc.	

Comme dans les expériences précédentes, le chlorure de sodium se montre un agent hautement activant, alors que les phosphates semblent n'exercer aucune influence bien précise sur la saccharification.

Je n'insisterai pas plus longtemps sur ce genre de recherches que je n'ai signalées que pour en montrer la simplicité d'exécution et la valeur démonstrative.

Les expériences pratiquées avec les amylases dialysées à fond sont la source d'enseignements bien plus précis, et de ce fait fixeront notre attention plus longtemps.

CHAPITRE II

SUR L'INACTIVITÉ AMYLOLYTIQUE DES AMYLASES SALIVAIRE ET PANCRÉATIQUE DIALYSÉES

Bierry, Henri et Giaja ont été les premiers, comme je l'ai indiqué au début de ce travail, à signaler l'inactivité absolue vis-à-vis de l'empois d'amidon ordinaire du suc pancréatique soumis à la dialyse et l'influence réactivante très spéciale des chlorures (particulièrement du chlorure de sodium).

J'ai été amené à répéter ces expériences afin d'en comparer les résultats à ceux que j'obtenais en faisant agir cette même amylase sur l'amidon purifié de Fernbach-Wolff.

Dans tous les cas où la dialyse a été poussée assez loin, j'ai observé une inactivité amylolytique aussi rigoureuse que celle signalée par ces auteurs. Mes recherches sur ce point ne font qu'apporter une confirmation aux leurs.

Je me contenterai de préciser certains points de technique, insignifiants par eux-mêmes mais très importants par leurs conséquences, puisque de leur prise en considération dépend la réussite d'expériences analogues, pratiquées avec l'amylase salivaire.

I. Inactivation de l'amylase pancréatique et réactivation par les chlorures.

Lorsqu'on soumet à la dialyse, suivant les procédés habituels, *contre de l'eau distillée ordinaire*, du suc pancréatique recueilli avec les précautions de pureté et d'asepsie indispensables à la conservation de son inactivité protéolytique normale, il se trouble dès les premières heures ; au bout de 24 heures il s'est formé dans le dialyseur un abondant précipité de matières albuminoïdes [1]. Séparons à ce moment le liquide du précipité et portons-le pendant quelques jours dans un nouveau dialyseur autour duquel nous renouvellerons fréquemment l'eau distillée. Après 5 ou 6 jours d'un tel traitement, mis en présence d'empois d'amidon ordinaire, le suc témoignera d'un affaiblissement considérable dans son activité diastasique ; mais il *sera encore capable de provoquer une saccharification largement appréciable par la liqueur cupropotassique*.

Pour arriver à la rigoureuse inactivité observée par Bierry, Henri et Giaja, il est indispensable de prendre une précaution : *celle de purifier l'eau distillée qui sert à la dialyse*.

Afin de remplir cette indication, il suffit de *redistiller dans un alambic d'argent* l'eau distillée ordinaire, telle qu'elle est

[1] Si par suite d'une négligence de technique le suc vient à s'activer spontanément, le précipité ne se forme pas ou se solubilise s'il s'était produit par suite d'un véritable phénomène d'autolyse au cours duquel disparaît l'amylase.

fournie aux divers laboratoires de l'Institut Pasteur. L'étude comparée de la conductibilité électrique de l'eau, déterminée avant et après redistillation, fait ressortir, d'une façon concrète, le degré de déminéralisation auquel on amène l'eau par ce traitement. Tandis que, mesurée par la méthode de Kolrausch, la conductibilité de l'eau distillée ordinaire est donnée par la formule : $K = 1{,}280 \times 10^{-5}$ environ, celle de cette même eau après redistillation dans un alambic d'argent est de : $K = 6{,}540 \times 10^{-6}$. On a ainsi gagné le bénéfice d'une décimale [1].

Le suc pancréatique, dialysé pendant les 24 dernières heures contre une telle eau redistillée, est dépouillé rigoureusement de toute activité diastasique vis-à-vis de l'empois d'amidon ordinaire.

Ce point de détail de la technique de la dialyse m'a paru utile et intéressant à mettre en évidence ; utile, parce que connu, il évitera des inexactitudes et des résultats erronés (comme je vais le montrer en ce qui concerne l'amylase salivaire) ; intéressant, parce qu'il montre d'une façon éclatante l'influence de « l'infiniment petit chimique » sur l'activité des diastases. Pour inactiver totalement une diastase amylolytique, il faut l'amener à un état de déminéralisation à peu près égal à celui de l'eau *redistillée*, résultat que ne permet pas d'obtenir, on le comprend, la dialyse contre l'eau simplement distillée.

Il n'est pas dans mes intentions d'étudier longuement le rôle réactivant des divers électrolytes vis-à-vis de l'amylase inactivée. Bierry, Henri et Giaja ont suffisamment montré que

[1] Pour obtenir de l'eau encore plus pure, il suffit de la redistiller deux fois, la première fois en présence de permanganate acide, la seconde en présence de baryte. La conductibilité électrique de l'eau ainsi obtenue est de $K = 3{,}110 \times 10^{-6}$ environ.

seuls les chlorures, bromures, iodures alcalins ou alcalino-terreux, étaient capables de restituer à la diastase son pouvoir. Mes recherches ne font que confirmer les leurs.

Le point sur lequel j'attire l'attention est le suivant : dans toutes ces expériences où l'on réactive par adjonction d'électrolytes une diastase inactivée par la dialyse, *on ne lui rend jamais qu'une infime partie de son pouvoir diastasique*. Dans les conditions les plus favorables, on n'obtient pas plus de 20 à 30 milligrammes de sucre réducteur en faisant agir pendant 3 heures à 50°, 0 cc. 2 de diastase dialysée sur 10 cc. d'empois à 3 %. Avant la dialyse un tel volume d'amylase eût été capable d'hydrolyser totalement cette quantité d'amidon, en un temps deux fois plus court.

Ces chiffres montrent que la réactivation conditionnée par les électrolytes n'est qu'une réactivation partielle, tout se passant comme si, par suite de sa déminéralisation, la diastase s'était en partie détruite.

II. Inactivation de l'amylase salivaire et réactivation par les chlorures.

En appliquant à la dialyse de l'amylase salivaire les détails de technique dont l'application m'avait paru indispensable à l'obtention du suc pancréatique inactif, j'ai été conduit à observer des faits passés inaperçus de ceux qui s'étaient livrés à des recherches identiques. Dans la première partie de ce travail, je faisais remarquer que la salive soumise à la dialyse contre l'eau distillée était encore active vis-à-vis de l'amidon ordinaire, même après plusieurs semaines de ce traitement. C'est le résultat auquel étaient arrivés tour à tour Sydney Cole en 1897, Guyénot en 1907 et récemment Slosse

et Limbosch. Pour ces auteurs, la salive ne se comportait pas comme le suc pancréatique ; c'est en partant de cette idée, je le rappelle, que j'ai été conduit à purifier l'amidon par la technique de Fernbach-Wolff.

Eh bien ! *lorsqu'on soumet à la dialyse l'amylase salivaire* non plus contre de l'eau distillée ordinaire, mais *contre de l'eau redistillée dans un alambic d'argent* ($K = 6{,}5 \times 10^{-6}$) *elle devient aussi rigoureusement inactive vis-à-vis de l'amidon ordinaire que le suc pancréatique dialysé*. L'anomalie qui semblait exister entre ces deux amylases ne relevait que d'une défectuosité de technique. Si Cole, Guyénot, Slosse et Limbosch n'étaient pas arrivés à constater l'inactivité absolue de la diastase, c'est qu'ils ne s'étaient sans doute pas mis à l'abri de cette cause d'inexactitude dont on saisit maintenant l'influence : l'imparfaite déminéralisation de l'eau qui sert à la dialyse.

La salive obtenue dans ces conditions est dénuée de toute espèce d'activité amylolytique pour l'amidon ordinaire, même après plusieurs jours de contact (à la condition d'expérimenter aseptiquement).

L'adjonction de NaCl, $CaCl^2$ restitue bien son activité à la diastase, mais, comme dans le cas précédent, elle ne lui en restitue seulement qu'une partie minime.

III. Les chlorures, condition nécessaire au fonctionnement des amylases.

Que l'on opère avec l'amylase de la salive ou avec celle du suc pancréatique, la quantité de chlorure de sodium capable d'activer la diastase d'une façon appréciable est *extraordinairement minime.*

Suc Pancr. D	Amidon 3 °/₀	NaCl N/15	Eau D	Sucre
0 cc. 2	15 cc.	0 cc. 1	0 cc. 9	0 gr. 009
0 cc. 2	15 cc.	1 cc.		0 gr. 018
0 cc. 2	15 cc.		1 cc.	0

Il a suffi, comme on le voit, *d'établir dans le milieu diastasique une concentration en NaCl d'environ* 0 gr. 019 °/₀₀ pour permettre à la propriété diastasique jusque là latente de manifester son activité. En d'autres termes, l'adjonction de 2 *centigrammes de chlorure de sodium par litre* à l'amylase inactivée par la dialyse lui a restitué une partie de son pouvoir diastasique dont elle était complètement dépourvue en l'absence de cet électrolyte.

Tout comme Bierry, Henri et Giaja, je n'ai pu réactiver la diastase par adjonction de phosphates, carbonates, oxalates, etc.

Il était intéressant de rechercher quelle pouvait être l'influence de l'adjonction des complexes salins (NaCl et Po^4H^2Na; NaCl et Po^4HNa^2, etc.) Dans ces conditions je n'ai jamais observé le moindre renforcement de l'activité diastasique. Au contraire, lorsque les quantités de phosphates ajoutés dépassent une certaine valeur, il y a fléchissement du pouvoir amylolytique, résultat qui s'explique par l'acidité ou l'alcalinité exagérée qu'apportent ces sels.

On peut donc conclure avec Bierry, Henri et Giaja que la *présence de chlorures — et en particulier des chlorures de sodium et de calcium — est indispensable au fonctionnement des amylases salivaire et pancréatique*, sans toutefois pouvoir préjuger en rien du mécanisme d'action de ces sels.

CHAPITRE III

ACTION DES AMYLASES DIALYSÉES CONTRE EAU REDISTILLÉE SUR L'AMIDON PURIFIÉ DE FERNBACH ET WOLFF.

Nous avons montré que les amylases salivaire et pancréatique *neutralisées par la dialyse*, encore actives sur l'amidon ordinaire, étaient dénuées de toute activité sur l'amidon de Fernbach-Wolff, et que les sels tels que les phosphates neutres, carbonates, oxalates neutres, restituaient à la diastase son activité, en restituant à l'amidon sa réaction amphotère primitive dont l'avait privé son mode de préparation.

Nous avons vu ensuite que, soumises à la dialyse *contre l'eau redistillée*, ces mêmes amylases devenaient inactives vis-à-vis de l'amidon ordinaire et que l'adjonction de chlorures leur restituait une partie de leur activité.

La nécessité pour le fonctionnement des amylases de cette double condition de milieu, établie par l'emploi de techniques différentes (amylase dialysée contre eau distillée — amidon Fernbach-Wolff et amylase dialysée contre eau redistillée — amidon ordinaire) peut se démontrer d'une

façon encore plus schématique, plus indiscutable, en combinant les deux techniques précédentes, c'est-à-dire en faisant agir sur de l'amidon de Fernbach-Wolff les amylases dialysées contre l'eau redistillée :

Suc Pancréatique dialysé contre eau redistillée. Amidon de Fernbach-Wolff 3 °/₀ :

Suc P — cc.		Amidon — cc.		NaCl N/15 cc.		$CaCl_2$ N/15 cc.		PO_4H_2Na N/15 cc.		PO_4HNa_2 N/15 cc.		Eau D — cc.	Sucre — gr.
0,3	+	15									+	2,7	0
0,3	+	15	+	2							+	0,7	0
0,3	+	15			+	2					+	0,7	0
0,3	+	15					+	0,2			+	2,5	0
0,3	+	15					+	1			+	1,3	0
0,3	+	15							+	0,2	+	2,5	0
0,3	+	15							+	1	+	1,7	0
0,3	+	15							+	2	+	0,7	0
0,3	+	15	+	2					+	0,2	+	0,5	0,104
0,3	+	15	+	2					+	1			0,138[1]
0,3	+	15			+	2			+	0,2	+	0,5	0,090
0,3	+	15	+	2			+	0,2			+	0,5	0

Salive dialysée contre eau redistillée, Amidon de Fernbach-Wolff à 3 °/₀.

Salive D —		Amidon —		NaCl N/15		PO_4H_2Na N/15		PO_4HNa_2 N/15	Sucre —
1 cc. 5	+	15 cc.							0
1 cc. 5	+	15 cc.	+	1 cc.					0
1 cc. 5	+	15 cc.					+	1 cc.	0
1 cc. 5	+	15 cc.	+	1 cc.			+	1 cc.	0 gr. 021
1 cc. 5	+	15 cc.	+	1 cc.	+	1 cc.			0

[1] Ce chiffre n'est pas exactement comparable aux autres par suite de l'inégalité de volume (0 cc. 3 en plus que dans les autres). L'erreur est cependant pratiquement négligeable.

Ces deux expériences, et notamment la première, qui est une des plus démonstratives que j'ai exécutées, mettent en évidence la nécessité de la réalisation des deux conditions de milieu étudiées jusqu'ici analytiquement. Ajoutés séparément, d'une part, les chlorures — agents réactivants dans les expériences effectuées avec l'amidon ordinaire — de l'autre, les phosphates — agents réactivants dans les expériences effectuées avec l'amidon de Fernbach-Wolff, sont tous deux dénués de toute espèce de propriété activante dans ces conditions. En apparence paradoxaux, ces résultats semblent, par leur diversité, suivant l'amylase ou l'amidon employé, dérouter toute interprétation. Il n'en est cependant rien ; ils sont tels que le raisonnement était en droit de les attendre.

Ils prouvent en effet qu'en *l'absence de chlorures* les amylases ne peuvent exercer leur activité ; *qu'en présence de chlorures, mais en l'absence d'une réaction de milieu favorable, elles ne sauraient fonctionner davantage ;* mais *qu'elles exercent immédiatement leur fonction, si l'on vient à réaliser dans le milieu où elles se trouvent les deux conditions nécessaires à leur activité : présence de chlorures, plus exactement d'ions Cl : présence de la réaction amphotère.*

Etant donnée l'exquise sensibilité des diastases purifiées à toute modification de milieu, on comprend aisément combien ces expériences sont délicates à exécuter.

Ford et Guthrie (27) opérant avec du malt et de l'amidon purifiés signalent que les expériences exécutées dans des conditions qui paraissent rigoureusement identiques ne donnent que rarement des résultats concordants « tant est grande la sensibilité des diastases purifiées agissant sur un amidon purifié ».

Avant de connaître ce travail, j'avais fait cette remarque pour m'être fréquemment heurté à des résultats contradictoires. Ces irré-

gularités sont attribuables à un manque de méticulosité dans les diverses manipulations. Pour obtenir des résultats constants, il est indispensable de n'employer que des tubes tour à tour lavés à la soude, à l'acide chloydrique, rincés à l'eau distillée et lavés à l'eau redistillée au moment de s'en servir [1]. Si l'on ne s'entoure pas de ces précautions, il peut rester dans le tube des traces de NaCl (formées au cours des lavages à l'acide et à la soude et non entraînées par le 1er lavage à l'eau), traces qui suffisent à rendre active une diastase qui ne devrait pas l'être. On comprend alors comment dans certains cas l'adjonction de phosphates neutres peut réactiver l'amylase inactive vis-à-vis de l'amidon de Fernbach-Wolff s'il se trouve, à l'insu de l'expérimentateur, des traces de NaCl.

Il ne faut pas oublier que dans ce genre de recherches une trace d'impuretés peut par sa présence exercer une influence plus considérable que n'en exercerait une quantité pondérable, par cela même qu'elle échappe à l'investigation de l'analyse chimique la plus délicate.

A ce point de notre étude, les résultats acquis peuvent se résumer ainsi :

La présence de chlorures alcalins ou alcalino-terreux et la *présence d'une réaction de milieu amphotère*, acide à la phénolphtaléine et alcaline à l'hélianthine, *sont deux conditions dont la réalisation simultanée est indispensable au fonctionnement des amylases salivaire et pancréatique.*

---

[1] Il sera même nécessaire, dans certains cas, de passer les tubes dans un jet de vapeur d'eau pendant 3 à 4 minutes, comme Ostwald l'a recommandé.

TROISIÈME PARTIE

SUR LA SACCHARIFICATION DE L'AMIDON DÉMINÉRALISÉ

Nous nous sommes attaché à démontrer dans la première partie de ce travail que l'amidon le plus pur qu'on a pu préparer contient encore des impuretés minérales dont la présence, quoique en quantité infime, exerce sur l'amylolyse une influence primordiale, et que, tant qu'on ne sera pas arrivé à s'affranchir de la présence de ces substances, dont le phosphore représente la plus grande partie, on ne pourra se faire une idée précise du rôle qu'elles sont appelées à jouer dans le phénomène de la saccharification.

Quel est en particulier celui du phosphore ? Est-il, comme l'a soutenu Roger (39), un élément aussi indispensable à la saccharification de l'amidon qu'au dédoublement de la saccharose par la zymase, par exemple ? Ne remplit-il qu'un rôle favorisant, adjuvant ? Ou bien encore, ne fait-il que conditionner une réaction de milieu nécessaire au fonctionnement des amylases ? Autant de problèmes actuellement en suspens, auxquels s'attache un intérêt théorique considérable, et qui ne pourront recevoir de solutions que du jour où l'on aura pu étudier l'action des *amylases déminéralisées sur un amidon lui-même totalement déminéralisé*.

Cette difficulté, à laquelle s'étaient heurtés de nombreux

expérimentateurs, notamment Osborne et Campbell (58), plus récemment M. Fouard (42), qui la déclarait infranchissable, vient d'être résolue tout récemment par M. Malfitano et Mlle Moschkoff (59).

Ces expérimentateurs sont en effet parvenus à éliminer de l'amidon toutes les impuretés minérales qui y adhèrent, *à le déminéraliser totalement*, et cela, sans lui faire subir de manipulations chimiques qui en altèrent facilement sa constitution.

J'étudiais depuis quelques mois déjà l'action des électrolytes sur la saccharification, lorsque ces auteurs ont fait connaître leur technique. M. Malfitano, avec une extrême amabilité dont je le remercie bien vivement, m'a initié aux multiples et minutieuses opérations qui permettent d'obtenir cette substance, en même temps qu'il en a mis à ma disposition quelques grammes ; grâce à quoi j'ai pu entreprendre la série de recherches dont je vais maintenant parler.

I. Préparation de l'amidon déminéralisé

Pour préparer cet amidon, il est nécessaire de suivre avec soin la technique suivante, dont j'emprunte la description à M. Malfitano et à Mlle Moschkoff (47).

« Nous allons décrire le procédé qui nous a permis de déminéraliser complètement l'amidon, en tirant parti de sa coagulation par la simple congélation des empois.

» On prépare au bain-marie, dans des creusets en porcelaine, des empois uniformes à 1 °/₀ avec de la fécule de pomme de terre et de l'eau pure ($K = 1 \times 10^{-6}$ environ). Après un chauffage en autoclave de 2 ou 3 heures, à 130°, on décante la liqueur

refroidie, fluide et opalescente, sans entraîner le faible dépôt sablonneux ; on la congèle dans un moule en nickel pur, puis on laisse fondre le glaçon compact obtenu. L'empois est alors transformé en un liquide tout à fait limpide, qui contient en solution la plus grande partie des sels et très peu d'amidon ; le reste forme des flocons que l'on sépare par filtration ou par centrifugation.

» Ces flocons ont été redissous dans l'eau pure et la même opération a été répétée trois ou cinq fois, avec cette seule variante que dans les derniers traitements le chauffage n'avait lieu qu'au bain-marie. La quantité d'amidon, qui reste dissoute après congélation, diminue très rapidement à mesure qu'on se débarrasse des sels. Ainsi un empois de fécule contenant 10 gr. 2 de matière sèche par litre, dont 0 gr. 036 de cendres donnait, après une première congélation, un liquide contenant 0 gr. 9 de matière sèche et 0 gr. 029 de cendres. Dans les opérations suivantes, l'extrait sec des liquides était respectivement de 0,2 ; 0,05 ; 0,02 et 0,01 par litre, la teneur en cendres ne pouvant être appréciée que par des mesures de conductivité électrique. Celle-ci était $K = 53 \times 10^{-6}$ dans l'empois primitif, ainsi que dans le liquide après congélation ; à la deuxième opération elle était de $K = 10 \times 10^{-6}$, et dans les opérations suivantes : $K = 4 \times 10^{-6}$. C'est là une limite qu'on ne peut dépasser et qui correspond à la conductivité de l'eau seule traitée de la même manière.

» De plus, après la deuxième congélation, les liquides ne donnaient plus qu'une faible coloration violette avec l'iode, due à la formation, inévitable pendant le chauffage, de faibles quantités de dextrines. Ces dextrines sont éliminées par lavage du coagulum à l'eau pure froide, et le produit obtenu est finalement séché, d'abord à froid, puis à 125°.

» En opérant ainsi, nous avons obtenu une matière très blanche et fibreuse dont quelques échantillons de 10 grammes,

incinérés à feu modéré, n'ont donné qu'une quantité de cendres inférieure à 2 milligr. Encore faut-il les considérer comme provenant des vases, car dans des expériences de contrôle faites avec notre eau pure seule, nous avons trouvé de 8 milligr. à 10 milligr. de résidu minéral par litre après l'avoir chauffé dans les vases. »

II. Influence des chlorures et des phosphates.

En possession de cet amidon, j'ai étudié d'abord la manière dont se comportaient vis-à-vis de lui les amylases salivaire et pancréatique dialysées à fond, et ensuite l'influence qu'exercent sur sa saccharification, d'une part les chlorures, de l'autre les phosphates.

Suc pancréatique dialysé sur eau redistillée, amidon déminéralisé à 1 °/₀ (dans eau redistillée) :

Amidon		Suc P.D.		NaCl N/15		$CaCl_2$ N/15		PO_4H_2Na N/15		PO_4HNa_2 N/15		Eau	Sucre
—		—										—	—
cc.		cc.		cc.		cc.		cc.		cc.		cc.	gr.
10	+	0,2									+	4,8	0
10	+	0,2	+	0,1							+	4,7	0,010
10	+	0,2	+	2							+	2,8	0,027
10	+	0,2			+	2					+	2,8	0,037
10	+	0,2					+	1			+	3,8	0
10	+	0,2							+	1	+	3,8	0
10	+	0,2	+	2			+	1			+	1,8	indos.
10	+	0,2	+	2					+	1	+	1,8	indos.
10	+	0,2					+	0,3	+	0,7	+	3,8	0
10	+	0,2	+	2			+	0,3	+	0,7	+	1,8	0,031

Salive dialysée contre eau distillée. Amidon déminéralisé à 1 %

Amidon — cc.		Salive — cc.		NaCl N/15 cc.		$CaCl_2$ N/15 cc.		PO_4H_2Na N/15 cc.		PO_4HNa_2 N/15 cc.		Eau — cc.	Sucre — gr.
10	+	0,5									+	3,5	0,003
10	+	0,5	+	2							+	1,5	0,040
10	+	0,5					+	0,2	+	0,8	+	2,5	0,002
10	+	0,5	+	2			+	0,2	+	0,8	+	0,5	0,035
10	+	0,5					+	0,4	+	0,6	+	2,5	traces
10	+	0,5	+	2			+	0,4	+	0,6	+	0,5	0,037
10	+	0,5			+	2	+	0,4	+	0,6	+	0,5	0,040
10	+	0,5			+	2					+	1,5	0,040

Salive dialysée contre eau redistillée. Amidon Malfitano 1 % (eau redistillée).

Amidon — cc.		Salive — cc.		NaCl N/15 cc.		$CaCl_2$ N/15 cc.		PO_4H_2Na N/15 cc.		PO_4HNa_2 N/15 cc.	
10	+	0,5									0
10	+	0,5	+	1							0,009
10	+	0,5			+	1					0,011
10	+	0,5					+	1			0
10	+	0,5							+	1	0
10	+	0,5	+	1			+	1			indosa
10	+	0,5	+	1					+	1	indosa.
10	+	0,5					+	0,4	+	0,6	0
10	+	0,5	+	1			+	0,4	+	0,6	0,010

Le résultat de ces expériences peut se résumer très succinctement sous la forme des trois conclusions suivantes :

1. Le suc pancréatique et la salive dialysés à fond ont perdu la propriété de saccharifier l'amidon déminéralisé.

II. L'adjonction à ces diastases de chlorures ($NaCl$-$CaCl^2$) leur restitue leur activité.

III. Les phosphates, aussi bien à l'état de phosphates monobasiques que de phosphates bibasiques, sont incapables d'activer ces amylases inactives. En quantités minimes même, ils s'opposent plus ou moins, suivant la concentration où ils sont employés, à l'action activante des chlorures.

Le *mélange des deux phosphates* fait perdre à chacun d'eux son influence inhibitrice et *pour une proportion déterminée de ces deux sels, il ne s'oppose en rien à l'action activante des chlorures; mais en aucun cas il ne saurait la renforcer.*

Ces propositions, en même temps qu'elles réclament quelques explications, soulèvent des considérations d'ordre général que nous allons discuter en les reprenant chacune successivement. Il n'y a pas lieu d'insister sur l'inactivité des amylases dialysées vis-à-vis de l'amidon déminéralisé, phénomène tout à fait naturel que faisait prévoir à coup sûr l'inactivité de ces mêmes amylases vis-à-vis de l'amidon ordinaire. Puisqu'en présence des phosphates de l'amidon, elles étaient dépourvues de tout pouvoir saccharifiant, il ne pouvait, à plus forte raison, qu'en être de même envers un amidon déphosphaté. Aussi l'intérêt de ces expériences résidait-il bien moins dans les résultats prévus à priori que dans la réalisation d'un milieu diastasique dépourvu rigoureusement de tous sels où l'influence d'un élément chimique quelconque ajouté pouvait être étudié avec la plus grande précision.

III. Les chlorures, condition nécessaire et suffisante du fonctionnement des amylases.

Ces expériences mettent surtout en évidence l'influence activante des chlorures de sodium et de calcium (en général des chlorures alcalins et alcalino-terreux.)

Au cours de recherches qu'il est inutile de rapporter ici, j'ai constaté que les bromures, les iodures jouissaient de la même propriété que les chlorures. Par contre, les sulfates, azotates, etc., nous ont paru dépourvus de toute influence favorisante.

Comme les bromures, iodures, ne se rencontrent qu'à titre exceptionnel dans les sécrétions salivaire et pancréatique, tandis que les chlorures en sont un constituant normal, nous sommes autorisé, pour synthétiser les résultats obtenus, à faire abstraction des premiers pour ne prendre en considération que les derniers. Dès lors, nous avons le droit de conclure, avec une rigueur quasimathématique, que *la présence de chlorures — alcalins ou alcalino-terreux — est une condition nécessaire et suffisante au fonctionnenent des diastases amylolytiques.*

De même qu'Harden a nettement mis en lumière la nécessité du phosphore dans la formule « Pas de fermentation alcoolique sans phosphore », de même nous pouvons affirmer le rôle des chlorures sous une forme analogue : « *Pas de saccharification diastasique sans chlorures*[1] ».

[1] Il n'est question, bien entendu, que de la saccharification par les amylases salivaire et pancréatique. L'amylase du malt exige-t-elle aussi la présence de chlorures ? Nous ne pouvons encore résoudre ce problème par suite de l'impossibilité où l'on se trouve actuellement d'inactiver le malt par dialyse.

La présence de chlorures a, dans ces phénomènes, j'y insiste, le double caractère de la *nécessité* et de la *suffisance*, ce qui revient à dire, en termes plus explicites, que la saccharification de l'amidon par ces diastases ne pourra se faire que si le milieu contient des chlorures ; mais cette condition, une fois réalisée, la diastase manifestera son activité sans qu'il soit besoin de faire intervenir un autre facteur quelconque.

La quantité de chlorures capable de déclancher l'activité diastasique d'une façon appréciable est extrêmement minime. L'adjonction à l'amylase inactive de 0 gr. 001 à 0 gr. 002 % de NaCl suffit à en permettre le fonctionnement. Des quantités dix fois plus petites sont encore efficaces à la condition qu'on laisse agir la diastase sur l'amidon pendant un temps plus long.

Je signale enfin que le chlorure de calcium m'a paru être légèrement plus activant que le chlorure de sodium (fait particulier qui ne ferait que confirmer l'influence du calcium sur la généralité des actions diastasiques). Ce n'est là qu'une impression qui s'appuie sur quelques données numériques ; elle aurait besoin d'être étayée par des méthodes de dosage plus précises que celles que j'ai utilisées.

IV. Sur le mécanisme d'action des chlorures.

Une dernière question se pose : Quel est le mécanisme de l'action des chlorures sur l'activité de la diastase ?

Sur ce point-là, nous n'avons aucune sorte de connais-

sance ; nous en sommes réduit, même pas à de vagues hypothèses, mais seulement à d'imprécises conjectures.

Il faut remarquer tout d'abord que l'influence des chlorures sur les amylases est loin d'être *spécifique*. Bierry et Frouin (31), dialysant du suc intestinal, ont vu qu'il devient inactif sur la saccharose et que par adjonction de divers chlorures on lui restitue son pouvoir. Dans un ordre d'idées analogues, Vines (60) a constaté que la diastase peptonisante des graines est fortement activée par addition de NaCl. On sait, du reste, que l'adjonction de chlorure de sodium communique aux diastases en général un renforcement d'activité remarquable.

Pour expliquer la nécessité des chlorures au fonctionnement des amylases, on a voulu faire de ces faits autant d'exemples destinés à illustrer la théorie des substances co-fermentaires, émises par G. Bertrand à la suite de ses recherches sur la laccase (Thomas (61). Malheureusement, nous ne croyons pas qu'il soit possible d'assimiler le rôle du chlorure de sodium dans les phénomènes de la saccharification de l'amidon ou de l'interversion du sucre à celui du manganèse ou du fer dans les oxydases, ou du calcium dans la coagulation du sang. L'intervention de ces substances minérales dans les processus fermentaires relève de mécanismes tout à fait différents. Transformant ici un proferment en ferment (calcium et coagulation du sang, calcium et activation du suc pancréatique), se combinant chimiquement là avec un produit de dédoublement (calcium et coagulation du lait par le lab), représentant ailleurs la portion vraiment active du ferment, la substance organique n'en étant que le substratum (manganèse et laccase, fer et oxydases), les substances minérales ne jouent point un rôle univoque et la même explication ne saurait également convenir à tous les cas.

Pour G. Bertrand, toute diastase serait la réunion de deux substances complémentaires, dont l'une la complémentaire active, de constitution ordinairement simple et chimiquement définie, serait capable à elle seule d'effectuer les transformations mêmes que provoque la diastase, mais avec lenteur et en proportions très élevées, et dont l'autre, la complémentaire activante, la substance organique, a pour rôle de conditionner purement les effets caractéristiques de la diastase, c'est-à-dire la disproportion entre les quantités de matière agissante et la quantité d'effet produit.

Tout à fait intéressante en ce qui concerne certaines actions diastasiques (oxydation par la laccase, hydrolyse par la pepsine), cette théorie ne peut nullement s'appliquer aux cas que nous étudions. Pour qu'elle soit valable ici, il faudrait démontrer que les chlorures, complémentaires actifs, sont doués de la propriété d'hydrolyser l'amidon et qu'ils tirent de la combinaison organique où ils sont engagés dans la diastase un accroissement énorme de cette propriété. Jusqu'ici les chimies restent muettes sur de telles actions.

Sans préjuger en rien du mécanisme de l'influence des chlorures, il est permis de penser que leur présence conditionne un état physique du ferment hors duquel il ne peut agir. Les travaux sur les colloïdes nous ont appris l'influence qu'exercent les électrolytes en général sur leur état physique. Si l'on considère les ferments, non plus comme des entités chimiques mais bien comme des propriétés inhérentes à certains états colloïdaux, on peut soupçonner l'influence qu'exercera sur l'activité diastasique la présence de certains électrolytes.

La généralité même de l'action des chlorures est un argument en faveur de cette conjecture, bien obscure et bien imprécise, nous ne nous le cachons pas.

V. Influence des phosphates.

En dernier lieu, le résultat de ces recherches permet de préciser nos connaissances relatives à l'influence des phosphates sur la saccharification.

D'abord, ces expériences démontrent de la façon la plus catégorique que le *phosphore n'est pas un élément indispensable à la saccharification.* En l'absence de ce corps, grâce au seul concours des chlorures, les *amylases salivaire et pancréatique peuvent hydrolyser l'amidon.*

Roger, à la suite d'expériences de précipitation de la salive par l'acétate d'urane, a soutenu que la présence de phosphates était nécessaire au fonctionnement de l'amylase. Il est permis de penser que les faits observés par cet expérimentateur sont susceptibles de recevoir une interprétation différente puisque dans les conditions où j'ai opéré, *certainement en l'absence absolue de phosphates*, l'amylase salivaire saccharifie avec la plus grande facilité l'amidon déminéralisé [1].

Bien mieux, dans certaines conditions, les phosphates exercent une influence nettement inhibitrice sur la saccharification. Cette action se fait sentir lorsqu'on ajoute à la diastase activée par les chlorures soit du phosphate monosodique,

[1] Il est intéressant, en passant, de souligner la différence des conditions d'action qui sépare deux catégories de diastases des hydrocarbones, la zymase et l'amylase, la première ne pouvant fonctionner qu'en présence de phosphore, la seconde ne réclamant pas le concours de ce corps.

soit du phosphate bisodique. Il ne se forme plus dans ce cas que des traces de sucre réducteur impossibles à doser par les méthodes habituelles et pour peu que l'on élève la concentration des phosphates ajoutés, la diastase perd toute activité.

Les phosphates sont donc ici nuisibles à la saccharification, par suite de leur acidité ou de leur alcalinité relative.

Si on ajoute maintenant à la diastase activée par les chlorures, non plus des phosphates monosodique ou bisodique, mais un mélange des deux phosphates, les résultats vont changer. Dans ces nouvelles conditions ils ont perdu leur propriété inhibitrice.

A une série de tubes contenant de l'amylase, du chlorure de Na et de l'amidon déminéralisé, ajoutons un même volume de différents mélanges des deux phosphates faits en proportions diverses ; nous verrons qu'il existe un mélange donné qui ne paralyse plus du tout l'action activante du NaCl. D'après mes recherches, des mélanges faits dans les proportions suivantes : 3 à 4 parties d'une solution N/15 de PO^4H^2Na pour 7 à 6 parties d'une solution équimoléculaire de PO^4HNa^2 permettent d'arriver à ce résultat. Sans phosphates, il se forme 40 milligr. de sucre réducteur ; c'est environ la même quantité qui s'est produite en présence du mélange favorable de phosphates (voir expériences p. 76-77).

A mesure que les proportions suivant lesquelles on a fait le mélange s'éloignent de ces dernières (mélange de 1 partie de PO^4H^2Na pour 9 de PO^4HNa^2, 2 de PO^4H^2Na pour 8 de PO^4HNa^2, etc., etc.), on voit les phosphates récupérer peu à peu leur action inhibitrice ; mais il est à remarquer que, par adjonction d'un mélange de phosphates dans lequel n'entrerait même que pour une très minime part l'un des deux constituants, on ne paralysera jamais l'activité diastasique.

Supprime-t-on complètement l'un des deux phosphates, alors l'action inhibitrice se fait immédiatement sentir au plus haut degré.

Cette action du mélange des deux phosphates peut se mettre facilement et élégamment en évidence par l'expérience suivante :

On porte au thermostat à 40° les deux tubes :

	Suc pancr. D.	NaCl N/15	Amidon 1 %	Phosphates
A)	0 cc. 4	0 cc. 5	10 cc.	0 cc. 8 PO^4H^2Na
B)	0 cc. 4	0 cc. 5	10 cc.	1 cc. 2 PO^4HNa^2

Au bout d'une heure, on cherche le sucre réducteur dans des échantillons prélevés dans chacun des tubes. Absence de maltose dans l'un et l'autre.

On verse alors le contenu de A dans B et on laisse à nouveau au thermostat 1 heure. Au bout de ce laps de temps il s'est formé des quantités de sucre réducteur facilement appréciables par la liqueur de FEHLING.

Le dernier point sur lequel j'insiste c'est que jamais dans les expériences où l'on ajoute des mélanges de phosphates faits suivant les proportions les plus favorables, on n'obtiendra de quantités de sucre supérieures à celles que l'on aurait obtenues en l'absence de phosphates, à l'aide des chlorures seuls. Les expériences que j'ai reproduites plus haut démontrent très nettement ce fait.

En somme, *les phosphates qui, à l'état de phosphates primaires ou de phosphates secondaires étaient nuisibles, deviennent, par leur mélange, indifférents vis-à-vis des amylases*, c'est-à-dire que ces dernières peuvent exercer

en leur présence leur activité de la même manière qu'elles l'exerceraient en leur absence.

Ces dernières expériences viennent corroborer de la façon la plus précise les conclusions auxquelles je suis arrivé dans la première partie de ce travail.

J'ai montré que les amylases salivaire et pancréatique étaient rigoureusement inactives, même en présence de NaCl, sur l'amidon préparé suivant la technique de Fernbach-Wolff, c'est-à-dire sur un amidon ne renfermant plus que les phosphates primaires et qu'il suffisait de restituer à l'amidon sa réaction amphotère primitive par adjonction de phosphates bibasiques pour le rendre sensible à nouveau à l'action de la diastase.

Par une technique différente, à l'aide d'un amidon déminéralisé, exempt de phosphore, complètement neutre, on arrive à des résultats identiques. En présence de phosphates primaires seuls ou de phosphates secondaires seuls, les amylases sont dénuées d'activité ; en présence d'un mélange de ces deux phosphates, elles en sont à nouveau douées.

Or, par adjonction de ce mélange de phosphates, nous n'avons fait que doter l'amidon déminéralisé, rigoureusement neutre à tous les indicateurs, d'une nouvelle réaction de milieu caractéristique, celle-ci, de l'amidon ordinaire, la réaction amphotère, acide à la phénolphtaléine et alcaline à l'hélianthine. Nous avons, non seulement rendu à l'amidon le phosphore qu'il avait perdu au cours de la déminéralisation, mais encore et surtout nous le lui avons restitué sous la forme même où il se trouve dans le grain d'amidon. L'amidon, obtenu par cette reminéralisation partielle peut être en effet, considéré, au point de vue qui nous intéresse, comme un amidon naturel, puisqu'il se comporte vis-à-vis

des indicateurs colorés, d'une part, des amylases de l'autre, comme de l'amidon ordinaire.

Nous sommes donc amené logiquement à cette conclusion qu'*en présence de phosphates*, la saccharification de l'amidon par les amylases salivaïre et pancréatique ne peut s'effectuer qu'*en milieu à réaction amphotère*, tandis qu'*en l'absence rigoureuse de phosphates*, ces diastases exercent leur action à la *neutralité absolue*[1].

Le phosphore ne joue, en somme, aucun rôle *actif* dans la saccharification[2]. Nuisible dans la plupart des cas, jamais nécessaire, sa présence n'est acceptable pour les diastases amylolytiques que dans les conditions que nous venons de préciser, qui sont naturellement celles qui sont réalisées dans le grain d'amidon naturel.

---

[1] J'ai étudié l'influence de très petites quantités d'acides et de bases sur la saccharification de l'amidon déminéralisé par les amylases. Les plus petites traces d'acides sont inhibantes ; il en est de même pour les bases. L'ensemble de ces expériences permet de comprendre l'influence activante que peuvent exercer les petites quantités d'acides, en faisant varier les proportions réciproques des deux phosphates contenus dans l'amidon. Les acides n'exercent d'influence qu'autant qu'ils se trouvent en présence de phosphates.

[2] Des expériences que je publierai ultérieurement m'autorisent à penser que le phosphore joue un rôle considérable dans l'édification même du grain d'amidon. Il m'a semblé favoriser nettement l'action de l'amylo-coagulase, ferment que j'ai pu mettre en évidence aussi bien dans la salive que dans le suc pancréatique.

CONCLUSIONS

Première Partie

Les amylases salivaire et pancréatique dialysées sont inactives vis-à-vis de l'amidon purifié suivant la technique Fernbach-Wolff.

Les chlorures, bromures, sulfates, les sels neutres en général, ne réactivent pas ces amylases inactives.

Les phosphates neutres, les carbonates, les bases et certains sels organiques (acétates, oxalates neutres, citrates neutres), restituent aux diastases leur activité, en restituant à l'amidon sa réaction amphotère.

La réaction amphotère — acide à la phénolphtaléine et alcaline à l'hélianthine — est une condition de milieu indispensable au fonctionnement des amylases.

Ces faits suscitent des réflexions intéressantes relatives à la chimie générale des actions enzymatiques.

Deuxième Partie

Chapitre Premier. — Les chlorures alcalins ou alcalino-terreux sont les agents activants par excellence des diastases amylolytiques.

Chapitre II. — Les amylases salivaire et pancréatique soumises à la dialyse contre l'eau distillée très pure sont rigoureusement inactives sur l'amidon ordinaire.

L'adjonction des chlorures leur rend une partie de leur activité.

Chapitre III. — La présence simultanée de chlorures et d'une réaction amphotère est indispensable au fonctionnement des amylases.

Troisième partie

Les amylases salivaire et pancréatique dialysées sont inactives sur l'amidon déminéralisé de Malfitano.

La présence de chlorures est la condition nécessaire et suffisante à l'activité de ces diastases vis-à-vis de l'amidon déminéralisé.

Les phosphates, jamais nécessaires à la saccharifica-

tion, deviennent indifférents lorsqu'ils sont dans la proportion où ils se trouvent dans l'amidon ordinaire.

En présence de phosphates, la saccharification de l'amidon par ces amylases ne peut s'effectuer qu'en milieu présentant une réaction amphotère.

En l'absence rigoureuse de phosphates, ces diastases exercent leur action à la neutralité absolue.

Conclusion Générale

Les impuretés qui font partie intégrante de l'amidon exercent sur la saccharification une influence aussi considérable que celles qui accompagnent les amylases.

BIBLIOGRAPHIE

(1) Green. — Journ. of. physiol. VIII. p. 354.

(2) Freund. — Médic. Jarhb. 1888, p. 259.

(3) Arthus et Pagès. — Arch. de physiol. 1890, p. 739.

(4) Pekelharing. — Uber die Bedeutung der Kalksalze fur die Gerinnung des Blutes. 1891.

(5) Arthus et Pagès. — Arch. de physiol. 1890, p. 331.

(6) Hammarsten. — Jahres. der Tierchemie. 1872, p. 118. 1874, p. 135 et 1875. p. 158.

(7) G. Bertrand et Mallèvre — Bullet. Soc. Chim. 13. 1895, p. 77 et 255.

(8) Fernbach et Wolff. — Ann. Instit. Pasteur, XVIII. 1904.

(9) Hikorokuro Yoshima. — Journ. of. chem. soc. XLVIII. 1883, p. 472.

(10) G. Bertrand. — Bull. Soc. Chim. XVII. 1897, p. 578, 619 et 753.

(11) Spitzer. — Arch. fur Ges. Phys., LXVII. 1897. p. 615.

(12) Dony Hénault. — Trav. Labor. P. Heger. t. I.

(13) Bach. — Berich. der Deut. Chem. Gesselch. 1910, p. 31.

(14) Sarthou. — Journ. de pharm. et chim. 1900, 15 juin.

(15) Delezenne. — C. R. Soc. Biol. LIX. 1905, p. 476 et 478.

(16) Delezenne et Frouin. — C. R. Soc. Biol. LIV. 1902, p. 692.

(17) Harden et Young. — Proceed. Chem. Soc. XXI. 1905, p. 189.

(18) Harden. — Journ. of Brewing Institute, 1910, décembre (en français *in* Annales brasserie et distillerie, 1911, 10 janvier).

SERMENT

En présence des Maîtres de cette École, de mes chers condisciples, et devant l'effigie d'Hippocrate, je promets et je jure, au nom de l'Être suprême, d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine. Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent, et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe; ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime. Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ! Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque !